

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE de MONTPELLIER 2**
Et **UNIVERSITE Cheikh Anta Diop de Dakar - Sénégal**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**
Et de l'unité de recherche **CIRAD-UMR 15 CMAEE**

Spécialité : **Microbiologie/Parasitologie**

Présentée par **HABIB SALAMI**

Diffusion d'un virus et évolution de
son génome dans les populations de
ruminants domestiques :

Application à l'épidémiosurveillance
de la "Peste des petits ruminants".

Soutenance le 13/02/2015 devant le jury composé de

Mr Bernard Godelle, Professeur, UM 2

Mr Hervé Bourhy, Directeur de recherche, IP, Paris

Mr Stéphane Bertagnoli, Professeur, ENVT

Mr Emmanuel Albina, Chercheur, Cirad

Mme Rianatou B. Alambédji, Professeur, EISMV, Dakar

Examineur

Rapporteur

Rapporteur

Dir. de thèse

Co-Dir de thèse

Invitées

Mme Geneviève Libeau (Chercheur, Cirad)

Mme Agnès Waret-Szkuta (Chercheur, Envt)



Quelle que soit la durée de la nuit, le jour finira toujours par se lever
— Dicton africain

A ma famille et mes amis.
A mes confrères vétérinaires.
Et à la France pour son hospitalité...

En premier lieu je tiens à remercier Bernard Godelle, Hervé Bourhy, Stéphane Bertagnoli, et Agnès Waret-Szkuta qui ont accepté de prendre part à mon jury de thèse. Je souhaite également remercier Nathalie Charbonnel et Sylvie Dallot pour avoir participé aux comités de suivi de thèse et pour la qualité des échanges scientifiques qui m'ont été très précieux.

Plusieurs personnes ont participé à la construction de ce projet de thèse, parmi ces personnes, je voudrais remercier en France, Dominique Martinez, Thierry Lefrançois et Renaud Lancelot pour m'avoir accueilli durant cinq longues années, au sein de l'UMR 15, Contrôle des maladies Animales Exotiques et Emergentes (CMAEE). A travers ces personnes, je remercie les assistantes de l'UMR et toutes les équipes qui la composent.

Je remercie très profondément Geneviève Libeau pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ces travaux de thèse, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et la détermination avec laquelle elle m'a aidé à surmonter les difficultés. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Emmanuel Albina pour avoir spontanément accepté de diriger cette thèse. Je le remercie de m'avoir guidé tout au long de ce travail de recherche et pour sa grande réactivité.

Mes remerciements vont également à Olivier pour m'avoir initié à la biologie moléculaire, pour sa disponibilité et son implication dans ces travaux de thèse ; ce travail est aussi le tien. Merci de m'avoir « recruté » dans l'équipe volley du bâtiment G, auprès d'Ignace, de Xavier, de Séraphin et de Renata ; merci également à nos adversaires du bâtiment K, Stéphane, Marilyne, Henri, Emilie et Michel; vous m'avez permis de mieux gérer le stress.

Je remercie également les collègues chercheurs et doctorants de l'UMR15, qui m'ont formé et soutenu durant ces années : Vincent pour m'avoir beaucoup aidé en phylogénie moléculaire, Cécile pour son aide précieuse dans la compréhension de la virologie, Patricia pour son appui scientifique et technologique, Juliette pour son aide dans l'analyse des séquences virales, Caroline pour son appui dans l'étude de l'évolution virale, Sylvain et David pour toutes les fois où vous avez répondu présent pour les questions informatiques. Merci pour votre disponibilité, votre soutien m'a été très utile.

A mes collègues de bureau, je dis un grand « Dieuridieuf » à Thierno pour toutes ces heures passées sur la mise en forme des tableaux et figures de ce manuscrit.

Merci à Stéphanie que j'appelle affectueusement « petite sœur » pour toutes "ces longues et difficiles journées de thèse", pour sa précieuse aide dans les analyses bayésiennes, pour ces discussions intéressantes que nous avons eu, merci pour tous ces bons moments que nous avons passés dans la bonne humeur et pour bien plus encore...

Merci « aux compagnons d'armes » Jennifer, Juliana, Clotilde et Haijin pour toutes les fois où j'ai débarqué dans vos bureaux pour vous demander de l'aide, pour votre amabilité.

Merci à Virginie de m'avoir aidé à comprendre la technologie NGS et pour toutes les heures de discussions passionnées sur ces méthodes.

Je remercie sincèrement Pachka pour la mise en forme de ce manuscrit de thèse, j'ai fortement apprécié son aide, sa disponibilité et ses conseils durant cette importante étape de la thèse. Merci pour cette aptitude à rendre service aux autres et pour sa grande générosité.

Je remercie également Renata, Lucia, Catherine, Colette, Christian, François, Karine, Laeticia et Phillipe Totté pour leur spontanéité à apporter des solutions scientifiques et techniques durant ces années de thèse.

Merci à Phillipe Caufour, pour ses précieux conseils, sa grande disponibilité et sa sincère amitié ; Merci à Eva et Alice pour leur générosité.

A l'UMR 22 AGIR, je remercie "Tata Betty", Timothé, Vladmir, Alexis, Gaelle, Marie, Arthur, Marie-Marie, pour votre contribution scientifique, technique et votre soutien moral.

Ce travail est le fruit de plusieurs collaborations ;

Je voudrais pour cela remercier tous les membres du Laboratoire National d'Elevage de Recherches Vétérinaires de Dakar pour m'avoir accueilli et soutenu durant ces mois passés au sein de l'équipe de virologie animale de l'ISRA. C'est ici l'occasion de remercier à « l'africaine » le Dr Yaya Thiongane qui n'a ménagé aucun effort pour la réalisation du projet et le bon déroulement des missions de terrain au Sénégal.

Je remercie sincèrement le Dr Modou Moustapha Lo pour sa forte implication dans l'encadrement de la thèse, pour avoir participé aux missions sur le terrain, et pour tous ces moments difficiles mais intéressants que nous avons passés au clair de lune au milieu de nulle part.

Je remercie la "doyenne" Mariam Diop pour son précieux appui technique, sa générosité et ses conseils scientifiques avisés.

Je remercie également le Dr Alpha Diallo, Madame Aminata Ndoye, pour les échanges scientifiques, leur soutien et leur implication.

Je remercie les chercheurs du laboratoire de parasitologie du LNERV, qui ont participé aux missions de terrain : je cite les Dr Momar Tall, actuel Chef du LNERV, le Dr Assane G. Fall, et Mr Dane Seye qui m'a initié aux missions de terrain. Je remercie l'ensemble du personnel de l'ISRA : Maryam, Sagna, Moussa, Ousseyne, Lamine, Issa, Oupah, Ndeye Sarr. .

J'adresse toute gratitude à ma co-directrice de thèse ; professeur Rianatou B. Alambéji, pour avoir accepté de suivre ces travaux à l'Ecole Vétérinaire de Dakar, et je saisi l'occasion pour remercier mon frère et ami Dr Assoumy pour sa grande implication dans la gestion de mon dossier de cotutelle. Je remercie Dr Aurélie Cailleau pour ses conseils scientifiques, son aide précieuse à la construction du plan de thèse.

Je voudrais adresser ma profonde gratitude à Jean Luc Guérin de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour sa collaboration dans le séquençage à haut débit des virus, sa participation à mes différents comités de thèse et pour son amitié. Dans l'équipe de virologie de l'ENVET, je remercie Guillaume pour son appui scientifique dans la préparation des librairies, le traitement bio-informatique des données, et sa sympathie. Je remercie également Mariette, Etienne, Gilles et Solène pour leur chaleureuse hospitalité.

Cette thèse a mis à contribution un nombre indénombrable de personnes, je ne pourrais pas tous les citer ici ; je voudrais remercier certains amis et collègue du Cirad qui ont fortement contribué à sa réalisation : Valère, Martin, Sergio, Ramzi, Harena, Fridolin, Illiassou, Racem, Elena, Faten, Enriqué, Magali, Illuminée, Johanna, Anaïs, Hermine, Yéo, Nadia et Clément. Enfin j'aimerais dire « misaotra » à Emilie, pour sa présence, sa compréhension, son soutien et ses conseils avisés ; « misaotra betsaka » pour les vacances malgaches, rien ne valait une grande île pour rédiger la partie bibliographique !

Résumé

La peste des petits ruminants (PPR), causée par un Morbillivirus, est l'infection virale la plus grave des caprins et ovins. Elle est largement répandue en Asie, au Moyen Orient et en Afrique. En Afrique elle est en émergence au nord et au sud du continent et représente un facteur majeur d'insécurité alimentaire pour la population agricole (70% des populations pauvres des régions considérées).

La PPR est un modèle d'étude des maladies transfrontalières car sa diffusion est très liée aux mouvements régionaux d'animaux vivants. La compréhension de cette diffusion est une condition essentielle à la mise en place de mesures de contrôle efficaces (vaccination, quarantaine, contrôle aux frontières etc.).

A notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour connaître l'ampleur de la diversité génétique du virus de la PPR (PPRV) au cours d'infections naturelles de petits ruminants et l'accumulation des mutations virales dans un circuit de diffusion. Or dans les pays d'élevages extensifs tropicaux l'identification et la traçabilité animale sont inexistantes, ce qui rend difficile la reconstruction des circuits de diffusion des animaux et du virus. Dans ces conditions, la diversité génétique du virus peut être utilisée comme marqueur de diffusion épidémiologique. L'objectif de cette thèse est d'utiliser la variabilité génétique du PPRV pour caractériser les lignées virales circulantes et retracer les processus de transmission du virus à travers un large territoire centré sur le Sénégal. En analysant 2 gènes de PPR nous avons estimé la vitesse d'évolution du virus sur une période de 4 années comprise en 2010 et 2014.

Les résultats montrent que les premières souches de la lignée II de PPRV ont été introduites en 2005 au Sénégal et dans les pays voisins. L'horloge moléculaire et l'arbre phylogéographique rapportés ici indiquent clairement que la lignée II maintenant enzootique en Afrique de l'ouest prend son origine au Nigéria. Les mouvements trans-africains à l'origine du déplacement Est-Ouest de la lignée II trouvent leur origine dans le commerce de bétail à la croisée des frontières, une évidence économique et culturelle en Afrique de l'Ouest.

Mots clefs : virus de la Peste des petits ruminants (PPRV) ; gène viral ; mutation virale ; circuit de transmission ; phylogénie ; phylogéographie ; surveillance épidémiologique, Sénégal.

Abstract

Peste des petits ruminants (PPR), caused by a Morbillivirus is one of the most important viral infections in sheep and goats. It is widely spread in Asia, Middle East and Africa. In Africa, it is an emerging disease in the north and the south of the continent. It is a major factor of food insecurity for the farming population (70% of the poor population in the tropical regions).

PPR is a study model of transboundary diseases; its spread is highly related to regional movements of livestock. Understanding the spread of PPR is an essential condition for the implementation of efficient control measures (vaccination, quarantine, border controls etc.).

Up to our knowledge, no studies have investigated the range of genetic diversity of PPR virus (PPRV) during natural infections in small ruminants and the accumulation of virus mutations during its spread. Further on, in tropical countries with extensive farming, animal identification and traceability are a current problem. In such conditions, the genetic diversity of the PPRv can be used as a marker of animal movement and spread of the virus.

The objective of this study was to investigate the genetic diversity of the PPRv in order to characterise the actual viral lineages and to retrace the transmission of the virus in Senegal and its surrounding countries. Analyzing two complete viral genes of the PPR, we have estimated the rate of evolution of this virus, in a four year period, between 2010 and 2014.

The results of the study show that the first strains of lineage II of PPRV have been introduced in 2005 in Senegal and its surrounding countries. Molecular clock analysis and phylogeographical reconstitution of the PPRV indicate that the lineage II, actually enzootique in western Africa, has its origins in Nigeria. This viral introduction from the direction East towards West, corresponds to the transboundary movement and commerce of livestock in the countries of western Africa, which represents the economic and cultural tradition of the people of this region.

Key words: Peste des petits ruminants virus, viral gene, virus mutation, transmission, phylogeny, phylogéographie, epidemiosurveillance, Senegal, West Africa

Table des matières

Résumé (Français/English)	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xiii
1 Introduction	1
1.1 Contexte justificatif	1
1.2 Problématique	1
1.3 Hypothèses et questions de recherche	2
1.4 Objectifs	3
1.5 Stratégie d'étude et plan de travail	3
2 Synthèse bibliographique	5
2.1 Généralités sur la Peste des petits ruminants	5
2.1.1 La maladie	5
2.1.2 Historique – Distribution géographique	6
2.1.3 Le virus de la peste des petits ruminants	8
2.1.4 Organisation du génome et protéines codées	10
2.1.5 Le cycle viral	15
2.1.6 Signes cliniques – Pouvoir Pathogène	16
2.1.7 Pathogénie	18
2.1.8 Diagnostic	19
2.1.9 Epidémiologie – Hôtes – Transmission	20
2.1.10 Moyens de lutte	22
2.2 Répartition géographique	23
2.3 Filière petits ruminants en Afrique de l'Ouest	25
2.4 Epidémiosurveillance et contrôle de la PPR en Afrique de l'Ouest	28
2.4.1 Surveillance épidémiologique en Afrique de l'Ouest	28
2.4.2 Contrôle de la PPR en Afrique de l'Ouest	29
2.4.3 Surveillance de la PPR au Sénégal	31

Table des matières

2.4.4	Contrôle de la PPR au Sénégal	31
2.5	Etat des connaissances sur l'évolution du génome des virus à ARN	31
3	Cartographie des souches de PPRV à partir du gène N partiel	35
3.1	Zone d'étude	35
3.2	Matériels et méthodes	36
3.2.1	Collecte du matériel biologique	36
3.2.2	Analyses de laboratoire	37
3.2.3	Analyse des séquences et détermination de la lignée géographique	38
3.3	Résultats	40
3.3.1	Description des foyers de PPR observés	40
3.3.2	Description des signes cliniques rencontrés	40
3.3.3	Isolement du virus à partir d'organes	41
3.3.4	Profil électrophorétique des produits PCR	41
3.3.5	Arbre phylogénétique basé sur 255 nucléotides du gène N	42
3.3.6	Analyse de l'arbre phylogénétique	43
3.4	Discussion	44
4	Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV	47
4.1	Introduction	47
4.2	Matériels et méthodes	48
4.2.1	Séquençage des gènes N et H	48
4.2.2	Analyse phylogénétique Bayésienne	54
4.2.3	Origine et distribution de la lignée II dans l'ouest de l'Afrique	55
4.3	Résultats	57
4.3.1	Reconstruction phylogénétique bayésienne	57
4.3.2	Origine et distribution de la lignée II dans l'ouest de l'Afrique	62
4.3.3	Phylogéographie	69
4.4	Discussion	71
5	Génomes complets et possibilités d'exploitation	77
5.1	Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV	79
5.2	Complete Genome Sequence of a Field Strain of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated during 2010-2014 Epidemics in Senegal	89
5.3	Synthèse	92
6	Discussion générale - Conclusion Perspectives	93
	Bibliographie	111
	Publications	113

Liste des Figures

2.1	Carte de l'évolution mondiale de la PPR de 1940 à 2012	7
2.2	Arbre montrant la relation phylogénétique entre les différents groupes de Morbillivirus basée sur les séquences nucléotidiques de leur nucléoprotéine	10
2.3	Schéma de la structure d'un Morbillivirus (PPRV)	11
2.4	Représentation du génome de la peste des petits ruminants	11
2.5	Cycle de vie du PPRV	16
2.6	Symptômes de la peste des petits ruminants	17
2.7	Cycle épidémiologique PPR	21
2.8	Distribution mondiale des quatre lignées du virus de la peste des petits ruminants (PPRV)	24
2.9	Flux et marchés de l'élevage au Sénégal	26
2.10	Cartographie des circuits régionaux de commercialisation	27
2.11	Cartographie des labobatoires producteurs de vaccins PPR en Afrique	30
3.1	Géo-localisation des différents sites visités (villages)	36
3.2	Localisation géographique des foyers confirmés de PPR en 2010; 2012, 2013 et 2014	40
3.3	Profil électrophorétique des produits PCR	41
3.4	Analyse Phylogénétique par la Méthode du Maximum de Vraisemblance.	42
4.1	Localisation des souches récoltées	48
4.2	Position des couples d'amorces permettant l'amplification du gène N complet	49
4.3	Position des couples d'amorces permettant l'amplification du gène H complet	49
4.4	Arbre phylogénétique bayésien (construit à partir de 55 séquences du gène N sous GTR + G4) et enraciné en utilisant une branche de lignée III pour montrer la relation phylogénétique à travers les souches de lignée II.	58
4.5	Arbre phylogénétique bayésien (construit avec le gène H sous GTR + G4) et enraciné en utilisant une branche de lignée III pour montrer la relation phylogénétique à travers les souches de lignée II.	59
4.6	Arbre phylogénétique bayésien (construit avec les gènes N/H sous GTR + G4) et enraciné en utilisant une branche de lignée III pour montrer la relation phylogénétique à travers les souches de lignée II.	60

Liste des Figures

4.7	Arbre phylogénétique daté MCC (séquences collapsées) basé sur 51 séquences N/H concaténées de souches virales PPR	63
4.8	Arbre consensuel (MCC Tree-BEAST) construit avec l'alignement N/H sous TN93 + G4	64
4.9	Distribution spatio-temporelle (2010-2012-2013) des souches du clade B2 . . .	65
4.10	Distribution spatio-temporelle (2010-2012-2013) des souches du clade B4 . . .	66
4.11	Distribution spatio-temporelle (2013-2014) des souches du clade B5	67
4.12	Distribution spatio-temporelle (de 2010 à 2014) des souches du clade B2, B4 et B5	68
4.13	Arbre phylogéographique basé sur 40 souches, les branches sont colorées en fonction des 7 zones géographiques.	69
4.14	Bayesian skyline plot	71
5.1	Read coverage of PPRV strain of Comoros 2012	84
5.2	Sequences alignment from the 16 genomes	85

Liste des Tableaux

2.1	Historique mondiale des déclarations de Peste des petits ruminants	7
2.2	Exemples de virus de la famille Paramyxoviridae	8
2.3	Récapitulatif des différentes protéines du PPRV	14
2.4	Réseaux d'épidémiosurveillance et de maladies surveillées en Afrique de l'Ouest et du centre	28
3.1	Séquences PPR utilisées pour l'analyse phylogénétique	39
4.1	Catalogue d'amorces spécifiques utilisées	50
4.2	Tableau des séquences N, H et NH	52
4.3	Résultats d'analyses des jeux de données	53
4.4	Tableaux de reconstructions classique et par codon	54
4.5	Résultats du test de l'horloge moléculaire utilisant la méthode du Maximum de vraisemblance	54
4.6	Résultats d'analyse BEAST	56
4.7	Tableau de comparaison des clades	61
4.8	Tableau de comparaison des dates des ancêtres communs (TMRCA)	74
5.1	List of specific primers	83
5.2	Number of full genomes generated	84
5.3	Results obtained from the analysis of 30 samples	85

Liste des abréviations

DIP : dynamique immunitaire de la population

MM : Modèles matriciels

PPR : Peste des petits ruminants

PPRV : Virus de la Peste des petits ruminants

PR : Petits ruminants

1 Introduction

1.1 Contexte justificatif

Dans les pays en développement, la croissance économique est en relation étroite avec les performances de l'agriculture en termes de volume de production, de qualité des produits et de sécurité sanitaire des denrées d'origine animale. En Afrique sub-saharienne, le secteur de l'élevage représente en moyenne 10% du PIB national et 30% du PIB agricole. Il constitue à ce titre, un des secteurs clés de l'économie des pays africains. La libre circulation des biens et des personnes, dans le cadre des communautés économiques africaines, représente un facteur de risque majeur en matière d'épidémiologie des maladies animales transfrontalières.

Après le succès rencontré dans l'éradication mondiale de la peste bovine, la peste des petits ruminants (PPR) demeure la maladie animale virale la plus meurtrière en Afrique. Elle est largement répandue en Asie, au Moyen Orient et en Afrique où elle est en émergence au nord et au sud du continent. La PPR est un facteur majeur d'insécurité alimentaire pour les populations dépendant de l'élevage, soit environ 70% des populations pauvres des régions considérées. Près d'un milliard de petits ruminants dans le monde est exposé au risque de cette maladie.

Depuis sa découverte en 1940 en Côte d'Ivoire, l'aire connue de distribution du virus de la PPR ne cesse de progresser, le PPRV colonisant des territoires jusque-là indemnes à la faveur de son introduction par les mouvements animaux, notamment en Asie centrale et surtout en Afrique septentrionale et australe. La PPR inflige ainsi d'importants préjudices aux éleveurs des pays du Sud.

1.2 Problématique

La carte de la répartition géographique du PPRV a été réalisée grâce à l'analyse des séquences variables du gène de la nucléoprotéine (N) et de celui de la protéine de fusion (F) [83, 149].

Quatre lignées phylogénétiques ont été ainsi définies, l'une installée en Asie (lignée IV) et les trois autres en Afrique (lignées I, II et III). Leur diffusion se superpose aux zones de commerce ou de transhumance des petits ruminants dans ces régions [15]. Cependant, les émergences récentes de la PPR, ainsi que l'actualisation des données virales à l'occasion des enquêtes de surveillance épidémiologique ou à des fins de recherche, bouleversent les connaissances maintenant anciennes de la distribution géographique des lignées.

Ainsi, la souche de PPRV isolée au Maroc en 2008, appartenant à la lignée IV, est très proche des souches virales isolées de 2000 à 2009 au Soudan [81]. Une origine asiatique a été attribuée à ces souches, alors même que les mouvements d'animaux ne permettent pas d'expliquer une introduction directe d'Asie ou du Moyen Orient vers l'Afrique. En effet, les flux commerciaux de ruminants sur pied semblent être à sens unique, de l'Afrique vers le Moyen Orient, comme documenté par des études économiques [6] et non l'inverse et révélé par les émergences récentes de maladies d'origine africaine au Moyen Orient, liées au commerce de bétail. C'est le cas de la fièvre de la Vallée du Rift ou de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo [53, 67, 151].

En ce qui concerne le PPRV, si la variabilité génétique des gènes viraux F ou N observée sur une courte séquence permet bien une définition en lignées du virus, elle semble avoir un potentiel restreint à tracer l'origine géographique des mouvements d'animaux ayant conduit à la diffusion de la maladie. Aussi, il est envisageable d'utiliser la capacité de l'ensemble du génome de PPRV à évoluer sur des temps relativement courts pour mettre en évidence les flux de virus entre foyers par l'intermédiaire des espèces hôtes.

1.3 Hypothèses et questions de recherche

Le PPRV, comme tous les virus à ARN négatifs, a potentiellement une forte capacité à muter pendant la réplication en raison de l'absence chez les enzymes virales ARN polymérases ARN-dépendantes (RdRp), de la fonction de relecture et de correction des erreurs de réplication. Ces ARN polymérases virales ont un taux d'erreur de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} nucléotides par cycle de réplication [50]. Ce taux rapide de changement évolutif dans les virus à ARN, est tel que ces virus offrent des opportunités particulièrement intéressantes pour étudier les processus épidémiques car leurs dynamiques évolutives et écologiques ont lieu à des échelles de temps similaires et interagissent potentiellement [129]. En effet, la rapidité d'évolution des virus à ARN est telle que la relation phylogénétique entre isolats peut souvent être résolue à partir d'échantillons recueillis à seulement quelques jours d'intervalle [33, 34, 171].

Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour connaître l'ampleur de la diversité génétique au cours d'infections naturelles de petits ruminants dans un foyer de PPR et l'accumulation de ces mutations dans un circuit de diffusion du PPRV. Or dans les pays d'élevages extensifs tropicaux, dans lesquels l'identification et la traçabilité animale sont inexistantes, c'est bien la difficulté à établir les circuits de diffusion des animaux et du virus qui nous incite à utiliser la diversité génétique du virus comme marqueur de diffusion épidémiologique.

Pour montrer que la variabilité génétique du PPRV est exploitable pour caractériser les lignées virales et retracer les processus de transmission du virus, nous proposons, à partir des gènes viraux ou du génome viral complet, d'étudier la dynamique évolutive et épidémiologique du PPRV par des approches d'épidémiologie moléculaire.

1.4 Objectifs

Ces travaux de thèse ont pour but de comprendre la dynamique évolutive et épidémiologique du PPRV afin de mieux gérer la surveillance et le contrôle de la maladie dans les pays transfrontaliers d'Afrique de l'Ouest. Il s'agira plus précisément d'étudier par des approches d'épidémiologie moléculaire, la distribution spatio-temporelle des souches de PPRV et d'utiliser cette information pour répondre aux questions peu accessibles par une approche d'épidémiologie descriptive telles que :

- La cartographie des lignées virales dans les pays d'Afrique de l'Ouest.
- La datation de l'introduction ou de la réintroduction de nouvelles souches dans un territoire donné.
- La reconstruction des mouvements géographiques des souches de PPRV et des animaux hôtes dans cette zone.

1.5 Stratégie d'étude et plan de travail

La stratégie d'étude consistait à récolter plusieurs souches de PPRV en échantillonnant tout le territoire sénégalais durant la période de 2010 à 2014. Dans l'optique d'avoir le plus de diversité génétique possible en étendant notre zone d'étude, notre laboratoire a demandé et obtenu des souches récentes de PPRV, détenues dans les laboratoires nationaux des pays proches du Sénégal à savoir la Mauritanie, la Guinée, le Mali et la Côte d'Ivoire.

Ces travaux de thèse seront articulés autour de 7 chapitres. Outre ce chapitre introductif, le chapitre 2 présentera une synthèse bibliographique sur la maladie, le virus de la PPR, la surveillance et le contrôle ; s'en suivra le chapitre 3 qui portera sur la cartographie des souches virales PPR identifiées dans la sous-région Ouest-africaine ; cette partie illustrera la définition de ces souches en lignées, ainsi que le potentiel restreint qu'ont les courts fragments de gènes à tracer l'hôte responsable de l'introduction du virus ou encore les mouvements géographiques des animaux à l'origine de la diffusion de la maladie. Pour approfondir le sujet, le chapitre 4 abordera l'utilisation de deux gènes complets dans la reconstruction des mouvements géographiques des PPRV dans la zone d'étude. Ce chapitre montrera que l'augmentation de la résolution moléculaire permet d'envisager l'étude de la dynamique évolutive des PPRV à une échelle régionale. Le chapitre 5 est une ouverture sur l'utilisation d'une résolution maximale comprenant des génomes entiers dans l'analyse de la diversité moléculaire. Il décrit

Chapitre 1. Introduction

nos travaux de séquençage « full génome » du PPRV par la technologie Illumina Mi-seq à partir d'ARN provenant d'échantillons de terrain et aborde les implications d'une telle technique dans l'approvisionnement des bases de données. Le chapitre 6 sera dédié à la discussion générale, à la conclusion, aux perspectives et aux recommandations qui en découlent.

2 Synthèse bibliographique

2.1 Généralités sur la Peste des petits ruminants

2.1.1 La maladie

La Peste des petits ruminants (PPR) est une maladie animale transfrontalière hautement contagieuse qui affecte principalement les caprins, les ovins et les petits ruminants sauvages. Cette maladie est causée par le virus de la peste des petits ruminants virus (PPRV), un virus du genre *Morbillivirus* appartenant à la famille *Paramyxoviridae*. Elle est caractérisée cliniquement par des écoulements nasaux et oculaires, de la diarrhée et l'érosion de différentes muqueuses [61]. Tous ces symptômes sont similaires à ceux de la peste bovine qui a été récemment éradiquée. Les virus membres du genre *Morbillivirus* ont une importance majeure en médecine humaine et vétérinaire à savoir : les virus de la peste bovine (RPV, pour Rinderpest Virus), de la rougeole (MV, pour Measles Virus), de la maladie de Carré (CDV, pour Canine Distemper Virus) et de la maladie des phoques (PDV, pour Phocine Distemper Virus).

La PPR est le plus souvent enzootique dans les pays où elle se trouve, avec un taux de mortalité et de morbidité pouvant atteindre 70-80% [42]. Elle est classée dans la liste des maladies animales à déclaration obligatoire de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE, pour Office International des Epizooties). Elle a été décrite dans le passé sous différentes dénominations : peste des petits ruminants, peste des espèces ovine et caprine, « pseudo-rinderpest », complexe stomato-pneumo-entérique et enfin « kata » (mot pidgin pour catarrhe) au Nigeria. La dénomination française « peste des petits ruminants », donnée par les premiers auteurs [60], a été retenue comme nom scientifique de la maladie. Toutes ces dénominations font référence à l'ensemble des symptômes qui la caractérisent et observés sur le terrain.

2.1.2 Historique – Distribution géographique

Initialement décrite en Côte d'Ivoire en 1940 [60], la PPR semble s'être cantonnée durant près de trois (3) décennies en Afrique de l'Ouest : au Togo, au Bénin et au Nigéria en 1941 (Cathou, 1944 cité par Mornet en 1956), au Sénégal en 1955 [107]. Les premières observations de la maladie en dehors de cette région ont été faites au Soudan en 1972 [54] puis en Ethiopie 1977 [126, 57]. Durant les années 1980, la PPR s'est répandue dans la péninsule arabique : Oman en 1983, Arabie Saoudite en 1988 ; elle atteint l'Inde en 1988 et plus tard l'Asie du Sud-Est [97, 160] ; la première incursion de la PPR en Afrique du Nord est notée en Egypte en 1989. De 1990 à 2000 la PPR s'étend et devient enzootique dans les régions d'Afrique de l'ouest et de l'Est (Burkina, Mali, Guinée, Ghana, Guinée Bissau, Soudan, Ethiopie), du Moyen Orient (Liban, Jordanie, Israël, Iran) et d'Asie (Afghanistan, Inde, Bengladesh, Pakistan).

De 2001 à 2013, une activité épizootique régulière à travers la ceinture Sahélo-saharienne a entraîné la propagation de la maladie dans de nouvelles régions non infectées d'Afrique ; on observe ainsi une extension rapide de la PPR vers le sud de l'Afrique (en Tanzanie, au Gabon, en République démocratique du Congo, en Somalie et au Kenya [154] et vers l'Afrique du Nord, Tunisie en 2008, le Maroc en 2008 et l'Algérie en 2011.

D'autres fronts de migrations sont observés vers l'Est de l'Europe : en Anatolie (Turquie d'Asie) et Thrace (Turquie européenne en 2004), en Moldavie 2009 et au Bhoutan en 2010. En Asie, la PPR a engendré des mortalités massives chez différentes espèces sauvages parfois en voie de disparition, notamment le grand bharal au Tibet [17, 18], le Bouquetin des Alpes au Pakistan [4], et la chèvre sauvage du Kurdistan [70]. En 2012, la PPR est signalée pour la première fois en Angola et Comores (Figure 2.1). Le tableau 2.1 résume les faits marquants de l'histoire de la colonisation de la PPR depuis sa découverte en 1940 jusqu'à nos jours.

2.1. Généralités sur la Peste des petits ruminants

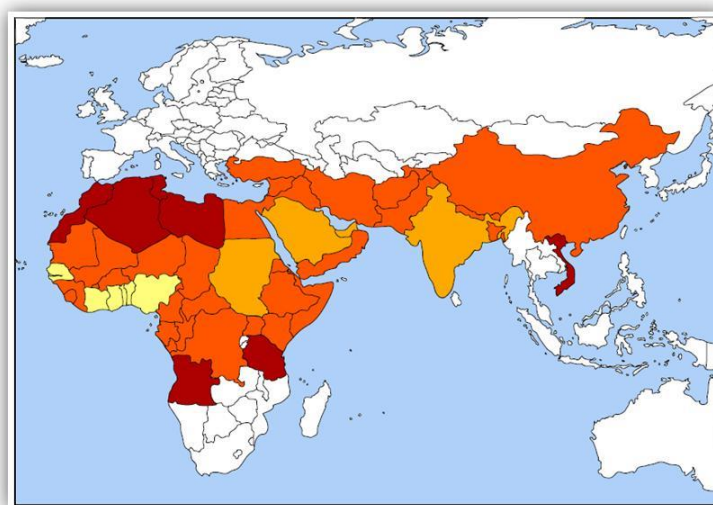


FIGURE 2.1 – Carte de l'évolution mondiale de la PPR de 1940 à 2012, 4 couleurs représentent les périodes d'extension de la PPR dans le monde

TABLE 2.1 – Historique mondiale des déclarations de Peste des petits ruminants

Faits marquants	Années	Historique	Références
Colonisation de l'Afrique de l'Ouest (30 ans)	1940	Découverte Côte d'Ivoire	[60]
	1941	Signalée au Dahomey (actuel Bénin)	[107, 42]
	1955	Signalée au Sénégal	[107]
	1972	Signalée au Soudan	[54]
1 ^{ère} apparitions en Afrique de l'Est	1977	Signalée en Éthiopie	[126]
	1983	Signalée en péninsule arabique	[160]
1 ^{ère} apparition au Moyen Orient	1988	Signalée en Inde (Asie) & en Arabie Saoudite	[97]
1 ^{ère} apparition en Asie	1989	Signalée en Egypte	[162]
1 ^{ère} apparition en Afrique du Nord	1990-2000	Extension Afrique (Nord-Ouest-Est) Moyen Orient-Asie	
	2001-2011	Extension vers le Nord et le Sud de l'Afrique	
1 ^{ère} apparitions en Angola et au Comores	2012	Signalée en Angola et aux Comores	[31]

2.1.3 Le virus de la peste des petits ruminants

Taxonomie – Classification

Le PPRV appartient à l'Ordre des **Mononegavirales**, famille des **Paramyxoviridae**, sous-famille des **Paramyxovirinae** qui est divisée en cinq genres distincts (Tableau 2.2).

TABLE 2.2 – Exemples de virus de la famille Paramyxoviridae

Sous-famille : <i>Paramyxovirinae</i>		
Genre <i>Morbillivirus</i>	Genre <i>Paramyxovirus</i> ou <i>Respirovirus</i>	Genre <i>Henipavirus</i>
Virus de la Rougeole	Virus parainfluenza humain types 1 et 3	Virus Hendra
Virus de la maladie de Carré	Virus parainfluenza bovin type 3	Virus Nipah
Virus de la peste bovine	Virus de Sendai	
Virus de la peste des petits ruminants	Genre <i>Rubulavirus</i>	Genre <i>Avulavirus</i>
Virus de la maladie des phoques	Virus des oreillons	Virus de la maladie de Newcastle
Morbillivirus des cétacés	Virus parainfluenza humain types 2 et 4	
Sous-famille : <i>Pneumovirinae</i>		
Genre <i>Pneumovirus</i>		
Virus respiratoires syncytiaux		

Les **Paramyxovirus** sont des virus à ARN enveloppé. Ce sont des particules globalement sphériques contenant une enveloppe lipoprotéique externe présentant de multiples projections ; une nucléocapside interne, pelotonnée et filamenteuse, à symétrie hélicoïdale qui entoure le génome viral.

Les virus PPRV, RPV, MV, CDV, et PDV sont classés dans le genre **Morbillivirus**. Tous ces virus sont définis par une communauté morphologique au sein des **Paramyxovirus**, une grande ressemblance quant aux effets cytopathogènes en culture cellulaire (syncytia, inclusions intra-cytoplasmiques et nucléaires), un aspect histopathologique commun (cellules géantes multinucléées), une forte proximité antigénique (forte homologie entre les protéines des différents membres du groupe), et une certaine spécificité d'hôte. Cette dernière caractéristique est de plus en plus nuancée à mesure de l'avancement des études portant sur les différents virus du groupe. Une des caractéristiques les distinguant des autres genres (mais commune aux **Henipavirus**) est l'absence d'activité neuraminidasique ; cette activité neuraminidasique serait toutefois présente chez PPRV et RPV [145].

Sur le plan clinique la forte ressemblance entre la PPR et la RP ainsi que la forte immunité

2.1. Généralités sur la Peste des petits ruminants

croisée entre leur agent causal, ont souvent conduit à considérer le PPRV comme un variant du virus de la peste bovine (RPV), mieux adapté aux petits ruminants. Cependant, l'isolement du virus en 1962 [62] et les études sur la protection sérologique croisée menées en 1970, ont permis de conclure que le RPV et le PPRV sont deux virus distincts mais très proches [61, 65]. Le PPRV a ainsi été classé en 1979 comme un membre appartenant au genre **Morbillivirus** dans la famille des **Paramyxoviridae**. Vers la fin des années 1980, un autre groupe de virus émergents affectant dramatiquement les mammifères aquatiques a été ajouté à ce genre : le virus de la maladie des phoques (PDV), les **Morbillivirus** des dauphins (DMV), les **Morbillivirus** des dauphins et marsouins (PMV) [20, 73, 120] (Figure 2.2). Récemment, sur la base de données de séquences du génome, un morbillivirus de chat appelé **Morbillivirus félin** (FmoPV), responsable de la néphrite tubulo-interstitielle chez les chats domestiques a été identifié [169].

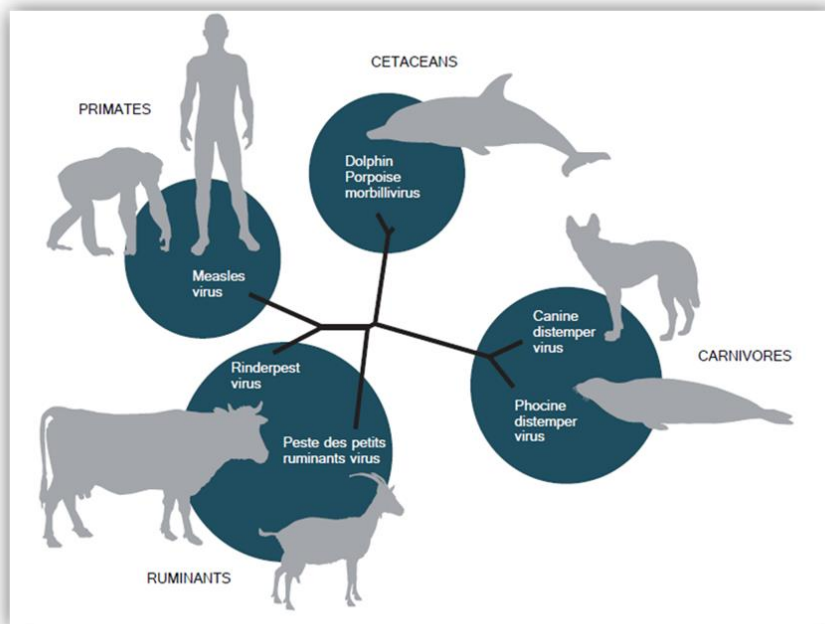


FIGURE 2.2 – Arbre montrant la relation phylogénétique entre les différents groupes de *Morbillivirus* basée sur les séquences nucléotidiques de leur nucléoprotéine [21]

Alors que l'on s'attendrait à ce que les deux virus de ruminants, PPRV et RPV, soient les plus proches au sein des *Morbillivirus*, l'analyse phylogénétique montre que le RPV est en fait, phylogénétiquement plus proche de MV que de PPRV [44].

2.1.4 Organisation du génome et protéines codées

Organisation du génome

Le virus de la peste des petits ruminants (PPRV) est un virus enveloppé, pléomorphe dont la taille varie de 400 à 500 nm. Son génome d'une taille de 15 948 bases, est composé d'une seule molécule d'ARN simple brin de polarité négative étroitement associée à de multiples copies de protéines N, dans une nucléocapside de symétrie hélicoïdale. La réplication du génome est soumise à la « règle de six » qui stipule que les génomes dont le nombre total de nucléotides est un multiple de six sont les mieux répliqués [137]. L'ARN génomique code pour six protéines structurales (N, P, M, F, H, L) et deux protéines non structurales (C et V) (Figure 2.3).

Aux extrémités 3' et 5' du génome, se trouvent deux régions non codantes de 52 nucléotides (nt) et de 37 nt non traduites (UTR) qui représentent respectivement le "Leader" et le "Trailer". La transcription et la réplication du virus sont contrôlées par ces deux extrémités. Le leader (positions 1 – 54) et la partie 3' non codante de la N (positions 55 – 107) constituent le promoteur génomique (107 bases), utilisé par la polymérase virale pour la synthèse des ARNm. La partie 5' non codante de la polymérase L (positions 15840 – 15908) et le trailer (15909 –

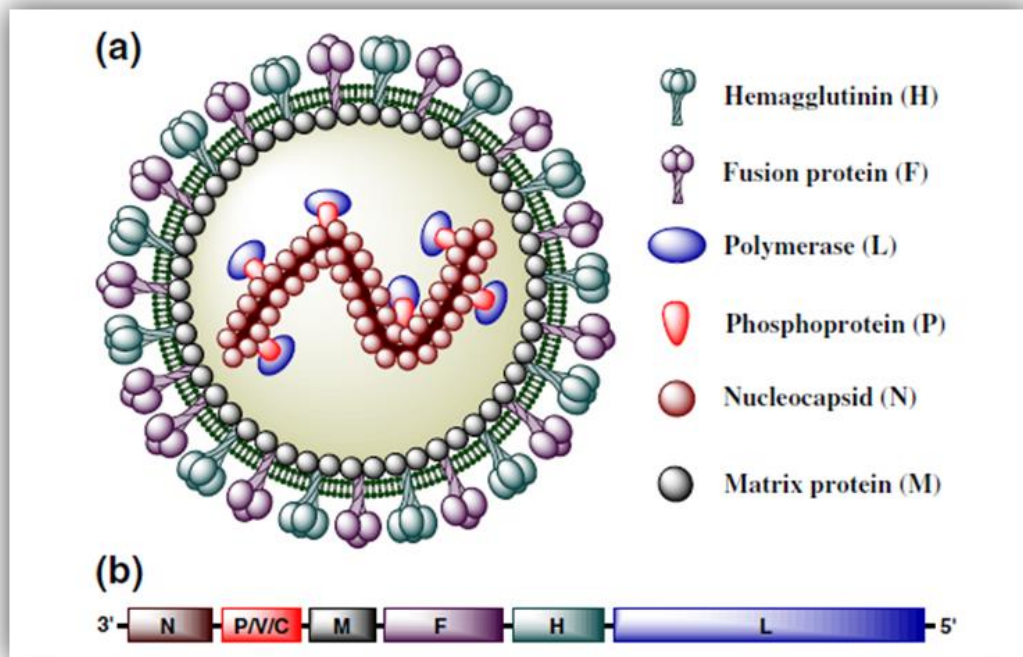


FIGURE 2.3 – Schéma de la structure d'un *Morbillivirus* (PPRV) [95].

15948) constituent le promoteur antigénomique (109 bases), utilisé par la polymérase pour la synthèse de l'ARN (+), intermédiaire de répllication du génome viral. Le leader et le trailer ont des séquences inversées complémentaires sur leurs 16 premières bases qui constituent probablement le signal de reconnaissance de la polymérase virale.

La région terminale de chaque gène est suivie d'une région conservée de trois nucléotides (GAA) appelée région intergénique (IG). La Région IG est également retrouvée à la jonction des séquences du leader (gène N) et du trailer (gène L). Chaque unité transcriptionnelle est composée d'IG, de séquences non codantes et de séquences conservées qui flanquent la région codante. Elle est synthétisée dans le mode «start-stop»[79].

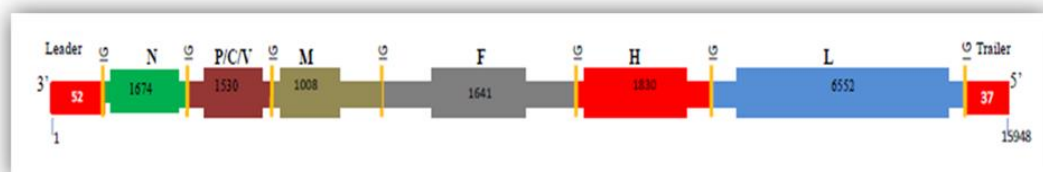


FIGURE 2.4 – Représentation du génome de la peste des petits ruminants [79]

Protéines codées

Les virus à ARN négatif "ARN(-)" (*Paramyxovirus*, (*Orthomyxovirus*), (*Rhabdovirus*) ont un génome dont la polarité est complémentaire à celle des ARN messagers (ARNm). Les génomes de ces virus ne peuvent donc en aucun cas être utilisés directement par les ribosomes cellulaires pour assurer la traduction. Ces virus utilisent une polymérase codée par le génome viral, il s'agit d'une ARN-polymérase ARN-dépendante qui assure les fonctions de transcription et de réplication du génome. Cette polymérase va synthétiser pour la réplication, un antigénome, l'ARN (+), copie complémentaire de la totalité du génome, qui servira ensuite de matrice pour la production de nouveaux génomes à ARN (-). La transcription quant à elle se fera à partir du génome à ARN (-), la polymérase codée par le virus formera des ARNm sub-génomiques correspondant aux parties codantes de chaque gène. Ces ARNm seront alors pris en charge par les ribosomes cellulaires pour être traduits en protéines.

Le virion de la PPR est composé de 6 protéines structurales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L). L'ARN génomique est associé à trois protéines virales pour former la ribonucléoprotéine (RNP) : N, P et L, protéines composées respectivement de 525, 509 et 2183 acides aminés (aa). La ribonucléoprotéine (RNP) constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire. La nucléoprotéine N est la protéine majoritaire de la RNP. Elle forme un manchon protecteur autour de l'ARN génomique et est responsable de la structure hélicoïdale de la nucléocapside. La région centrale de la protéine est engagée dans le processus d'auto-assemblage et d'encapsidation de l'ARN génomique. La phosphoprotéine P interagit avec la protéine N et favorise l'encapsidation des ARN viraux néo-synthétisés. Elle interagit aussi avec la protéine L pour former le complexe de polymérisation de l'ARN polymérase ARN-dépendant, responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication de l'ARN viral génomique. La polymérase L possède toutes les activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation de l'ARN, initiation, élongation, terminaison, coiffage, méthylation et polyadénylation.

Lors de sa libération, le virus emprunte son enveloppe à celle de la cellule hôte dans laquelle s'insèrent trois autres protéines virales : M, F et H. La protéine M, la plus petite des protéines virales (335 aa) recouvre la face intérieure de l'enveloppe virale et sert de lien entre la nucléocapside et les deux glycoprotéines de surface F et H. Cependant, suite à une étude de cryotomographie électronique Liljeroos et al., 2011 [94] ont montré que la protéine de matrice de MV forme des hélices de revêtement de la ribonucléocapside plutôt qu'un revêtement du feuillet interne de la membrane comme on le pensait auparavant. Le complexe qui se forme à l'intérieur du cytoplasme est en outre transporté vers la membrane de la cellule hôte dans laquelle les deux autres glycoprotéines d'enveloppe externes, la fusion (F) et l'hémagglutinine (H), sont insérées. La protéine d'hémagglutinine, longue de 609 aa, est une protéine glycosylée qui permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte. La seconde protéine glycosylée est la protéine de fusion F. Composée de 546 aa, elle est responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte. Cette activité n'est acquise qu'à la suite d'un proces-

2.1. Généralités sur la Peste des petits ruminants

sus de maturation qui aboutit au clivage de F en deux sous-unités F1 et F2. Ce clivage, effectué par une protéase cellulaire, permet de libérer à l'extrémité de F1 un peptide très hydrophobe dit peptide de fusion [104].

Le génome viral code également pour deux protéines non structurales C et V qui ne sont retrouvées que dans les cellules infectées. Leur synthèse est dirigée par le gène de la protéine P. Au cours de la multiplication virale, le gène correspondant à cette protéine est transcrit en deux ARNm. Le premier est une copie exacte du gène. Il est traduit en P (507 aa) à partir du premier codon d'initiation AUG rencontré par les ribosomes de la cellule infectée. Cependant il existe un deuxième codon AUG en aval du premier, en position 23 sur l'ARN, et qui se trouve dans des conditions favorables pour jouer une fonction de codon d'initiation. Il permet la synthèse d'une deuxième protéine C (177 aa) plus petite que P.

Le second ARNm du gène P n'est pas une copie exacte du gène car il comporte une base G supplémentaire insérée dans l'ARN au cours de sa synthèse par un mécanisme de bégaiement de la polymérase connu sous le terme « editing ». L'addition de cette base supplémentaire est faite à un point précis de l'ARNm, en position 693. La conséquence de cette insertion est le changement du cadre de lecture de l'ARNm à partir de cette position, générant un nouveau codon stop à la position 894 : ce processus entraîne la synthèse d'une protéine plus courte, la protéine V (298 aa). La protéine C a un rôle dans la transcription et la V, dans la réplication du génome viral. Ces deux protéines interfèrent également avec l'immunité innée en bloquant la réponse interféron (Tableau 2.3) [104].

Chapitre 2. Synthèse bibliographique

TABLE 2.3 – Récapitulatif des différentes protéines du virus de la peste des petits ruminants et de leurs fonctions [104]

Protéine	Taille AA	Fonctions	Références
N	525	<ul style="list-style-type: none"> • Interactions avec ARN et ARN Polymérase lors de la transcription et la réplication • Interactions N-N pour auto-assemblage autour de l'ARN génomique lors de la réplication et la formation de la nucléocapside • Interactions avec P et le complexe P-L • Interactions avec M lors du bourgeonnement qui suit l'assemblage des éléments de la ribonucléoprotéine • Rôle dans la régulation cellulaire de la protéine du choc thermique Hsp72 et du facteur 3 de l'interféron • Rôle dans régulation du récepteur de la nucléoprotéine 	[44, 92, 25, 26, 20, 64, 14]
P	507	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans la transcription (partie C term) et la réplication (partie N term) • Positionne la protéine L sur la matrice N-ARN • Chaperonne la nouvelle protéine N et oriente la nucléoprotéine N libre dans la formation de RNP 	[20]
C	177	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans la virulence • Implication dans le contrôle de la réponse innée de l'hôte par le blocage de la synthèse des interleukines interférons 	[20, 27]
V	298	<ul style="list-style-type: none"> • Implication dans la régulation de la synthèse de l'ARN viral • Facteur de virulence important interférant avec l'immunité antivirale de l'hôte en inactivant l'interféron de type I et II 	[20]
M	335	<ul style="list-style-type: none"> • Permet le contact entre les glycoprotéines F et H et la RNP • Rôle dans la morphologie du virion • Rôle primordial dans incorporation nucléocapside dans le virion après initiation du bourgeonnement de la membrane cellulaire 	[64, 10]
F	546	<ul style="list-style-type: none"> • Responsable de la fusion de la membrane virale avec celle de l'hôte pour libérer la RNP dans le cytoplasme • Région C term, rôle dans l'ancrage de la protéine à la membrane 	[20, 102]
H	609	<ul style="list-style-type: none"> • Permet attachement du virus aux récepteurs membranaires cellulaires • Région N term, sert d'ancrage transmembranaire par son domaine hydrophobe ; a une fonction signal peptidique ; participe aux échanges cytoplasmiques • Possède une activité neuraminidasique et hémagglutinante 	[145, 20, 92]
L	2183	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle dans la fixation de l'ARN viral • Activité polymérase • Activité enzymatique kinase et ATPase 	[10]

2.1.5 Le cycle viral

Le cycle viral du PPRV dure 6 à 8 h dans des cellules en culture [79]. Ce cycle peut être décomposé en trois grandes étapes (1) l'attachement, la pénétration, et la décapsidation qui conduisent à l'internalisation du génome viral dans la cellule cible, (2) l'expression des gènes et la réplication qui vont, respectivement, assurer la synthèse des protéines codées par le génome viral et permettre la multiplication de ce génome, (3) l'assemblage et la sortie qui vont mener à la production et la libération de particules virales infectieuses, capables de propager l'infection à d'autres cellules (Figure 2.5).

L'attachement, la pénétration, et la décapsidation

La première interaction cellule hôte-agent pathogène (fixation) s'effectue par la liaison du virus au récepteur (s) de cellules par l'intermédiaire de sa protéine H. A l'instar de MV et CDV, les souches sauvages de PPRV utilisent deux récepteurs cellulaires naturels : le SLAM pour "signalling lymphocyte activation molécule" ou de la protéine CD150 et la Nectin-4. Les paramyxovirus pénètrent dans la cellule hôte grâce à la fusion des membranes virales et de la cellule hôte. Pendant cette fusion, les domaines HR1 et HR2 de la protéine F interagissent entre eux pour mettre les membranes virales et cellulaires de l'hôte en proximité étroite [100].

L'expression des gènes et la réplication

Après la libération de la nucléocapside, la transcription virale commence dans le cytoplasme. La protéine L fonctionne alors comme une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) et initie la transcription des ARNm dans le cytoplasme. Comme chez tous les paramyxovirus, la RdRp se lie au promoteur de l'ARN génomique, le cadre de lecture ouvert (ORF) initie ensuite la transcription d'une manière " stop-start". La réplication virale nécessite une quantité de protéines qui est régulée par un gradient d'ARNm transcrits pour chaque gène. Le gène codant la protéine N qui est nécessaire en grande quantité, est situé plus près du promoteur génomique GP et est par conséquent le plus abondamment transcrit (Figure 2.5). En revanche, la protéine L se trouve la plus éloignée du GP et donc transcrit en plus faible quantité [109].

Assemblage et libération

Le processus d'assemblage et la libération des *Morbillivirus*, y compris PPRV est assez mal connu. Comme chez tous les virus enveloppés, les *Paramyxovirus* forment des particules virales lorsque tous les composants de structure du virus, y compris les glycoprotéines virales et RNP virales sont assemblés dans les sites sélectionnés où les virions bourgeonnent, puis pincent les membranes pour obtenir la libération de particules (Figure 2.5) ; ceci permet la transmission de l'infection de la cellule infectée aux nouvelles cellules sensibles [79, 66].

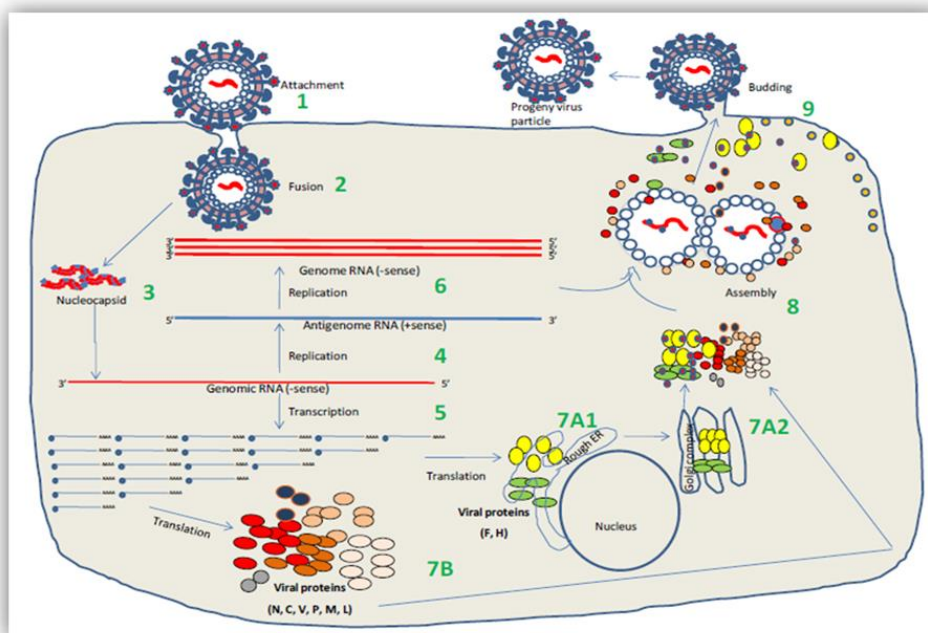


FIGURE 2.5 – Cycle de vie du PPRV. [79] (1). Attachement du virus aux récepteurs cellulaires (SLAMF7/Nectin-4) par l'intermédiaire de sa protéine HN. (2). Fusion avec la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines F et HN (3). Sortie du génome viral dans le cytoplasme. (4). Réplication du génome viral par la RdRp codée par le virus (5). Synthèse de l'ARNm par la RdRp en mode «start-stop» (mécanisme de contrôle de la quantité de protéine produite). (6). Synthèse de l'ARN de sens positif (ARN antigénomique ou ARN complémentaire, cRNA). (7). Synthèse des protéines virales : des protéines F et H sont synthétisées sur réticulum endoplasmique rugueux (7A1) puis translocation à travers l'appareil de Golgi complexe (7A2), où des modifications post-traductionnelles ont lieu. D'autres protéines virales (N, P, C, V, M, L) sont synthétisées sur les ribosomes (7B). (8). Assemblée des virions fils. (9). Le bourgeonnement des virions de la descendance à la membrane plasmique.

2.1.6 Signes cliniques – Pouvoir Pathogène

Signes cliniques

La PPR est classiquement une maladie respiratoire aiguë. Dans sa forme aiguë, la maladie se manifeste 5 à 6 jours après infection par une dépression de l'animal probablement due à la fièvre et par la perte de l'appétit. Rapidement les muqueuses oculaires et buccales se congestionnent, puis les sécrétions oculaires et nasales d'aspect séreux deviennent purulentes. L'abondance de pus qui colle les paupières et bloque les narines entraîne une difficulté respiratoire très marquée. L'animal atteint développe parfois une toux humide et productive. Dans la cavité buccale, les foyers nécrotiques discrets, petits et grisâtres se développent sur un fond rougeâtre. Quand la fièvre commence à baisser environ 4 à 5 jours après le début de la maladie, des taches nécrotiques apparaissent, s'élargissent et forment de vastes plaques

2.1. Généralités sur la Peste des petits ruminants

diphtériques. Ces lésions couvrent la cavité buccale de l'animal et produisent une odeur fétide. Chez les femelles, les lésions peuvent également être observées sur la membrane de la vulve et s'accompagnent d'avortement [2, 77, 78]. En plus des lésions nécrotiques, se développe une diarrhée pouvant être dysentérique. La sévérité de cette diarrhée est corrélée dans de nombreux cas à l'évolution clinique de la maladie. Dans 70 à 80% des cas, les animaux meurent dans les 10 à 12 jours après l'apparition de la maladie. Les animaux qui survivent seront guéris en une semaine tandis que 100% des animaux atteints de forme suraiguë meurent (Figure 2.6).

Sur le plan lésionnel, la forme aiguë de PPR se caractérise par des érosions hémorragiques et nécrotiques dans la bouche, un exsudat mousseux dans la trachée, une congestion des voies respiratoires et digestives. Le poumon présente une bronchopneumonie fibrineuse, en particulier dans les lobes cardiaques et apicaux. Les ganglions lymphatiques mésentériques peuvent être hypertrophiés et congestionnés. Des lésions hémorragiques linéaires sont vues dans la caillette, le caecum, le côlon et le long des plis du rectum [9, 29, 65, 118]. Des zébrures caractéristiques peuvent être observées dans le rectum. La rate est congestionnée. Les ganglions lymphatiques sont également congestionnés, œdémateux et légèrement hypertrophiés. Le foie est parfois nécrosé. Des lésions congestives et même nécrotiques sont parfois observées au niveau des reins. L'examen histopathologique révèle des inclusions intracytoplasmiques et intranucléaires virales ainsi que la présence de granules éosinophiles dans les cellules des différents tissus (poumon, la muqueuse buccale, des reins et de l'épithélium de l'intestin), qui peuvent fusionner pour former des syncytia. Le PPRV a été identifié également dans le cerveau, même si aucun des troubles neurologiques observé dans le cas de la rougeole ou la maladie de Carré n'a encore été associé à ce virus chez les petits ruminants [163].



FIGURE 2.6 – Symptômes de la peste des petits ruminants. (Photo H. Salami)

2.1.7 Pathogénie

Peu d'études sur la pathogénèse de la PPR ont été entreprises à ce jour. La plupart des connaissances actuelles découlent principalement des résultats des études sur des virus étroitement liés au PPRV (exemple : RPV, MV et CDV). La principale voie d'infection du PPRV est respiratoire comme chez les autres *Morbillivirus*. Dans le cas de MV, le principal récepteur cellulaire est la molécule d'activation de signalisation lymphocytaire (SLAM aussi appelé CD150) exprimée à la surface des lymphocytes. Cela reflète le fort tropisme lymphoïde du virus et a permis de mieux comprendre le modèle d'infection de l'hôte par MV [159, 170, 19, 125, 101, 140]. Ces nouvelles études suggèrent fortement que MV pénètre dans l'hôte au niveau alvéolaire par les macrophages et infecte les cellules dendritiques qui vont par la suite disséminer le virus dans le tissu lymphoïde associée aux muqueuses (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT) et dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques. Cette infection se traduit par une amplification locale du virus et sa dissémination systémique subséquente via les lymphocytes infectés [89].

Un autre récepteur cellulaire, le CD46 exprimé de façon ubiquitaire dans toutes les cellules nucléées humaines, a été découvert dans les années 90. Sa fonction principale est l'inhibition de l'activation du complément et récepteur des souches atténuées de MV [113, 49]. Les *Morbillivirus* sont également épithéliotropes puisqu'on les retrouve dans différents tissus non lymphoïdes de l'hôte tels que le poumon, le rein, le cœur et le cerveau. Tous ces virus utilisent par ailleurs un récepteur alternatif présent à la surface des cellules épithéliales pour se disséminer à l'ensemble de l'hôte. Cet autre récepteur cellulaire la protéine Nectin-4 a été identifié chez MV en 2011, [108, 116]. Les deux récepteurs que sont le SLAM et la Nectin-4 semblent être impliqués dans la formation de syncytia et la dissémination du virus d'une cellule à l'autre sans libération [117]. L'animal infecté par le PPRV, s'il survit, développe une immunité à vie contre la maladie, cependant l'infection s'accompagne d'une immunosuppression transitoire et profonde de l'hôte, communes à toutes les infections virulentes à *Morbillivirus* favorisant les surinfections bactériennes [71, 130, 142].

Les vaccins conservent encore des effets immunosuppresseurs résiduels et transitoires. Dans le cas de RPV, il a été montré que le degré de la lymphopénie est corrélé à la virulence du virus et de la gravité de la maladie qu'il provoque [132, 167]. Ces effets immunosuppresseurs ne résultent pas uniquement de la destruction des cellules lymphoïdes au cours de la réplication virale, mais il semble qu'ils soient aussi dus aux protéines virales elles-mêmes. En effet, comme c'est le cas pour le MV, la co-expression à la fois de la F et de la H de RPV est suffisante pour induire une immunosuppression in vitro [68, 141]. Il a également été démontré que la protéine N de MV, PPRV et RPV se lie à un récepteur de la cellule et cette liaison peut inhiber spontanément (1) la prolifération cellulaire en arrêtant les cellules dans les phases G0 / G1 du cycle cellulaire [84] et (2) les facteurs impliqués dans les réactions inflammatoires de l'hôte [75, 74, 156]. L'apoptose des cellules a été notée chez des caprins infectés par le PPRV [106]. De nombreuses protéines virales contribuent au dérèglement de la réponse immunitaire de l'hôte. Outre les protéines H, F et N mentionnées ci-dessus, les deux protéines non structurales, C et

V, inhibent l'action de l'interféron [112, 119, 146].

2.1.8 Diagnostic

Pendant longtemps la PPR a été négligée au profit de nombreuses maladies aux symptômes similaires telles que la RP et la pasteurellose et dans bien des cas de suspicion de PPR, l'infection est due à *Pasteurella*. Devant la nécessité d'un diagnostic différentiel, le diagnostic clinique de la PPR doit être confirmé par des tests de laboratoire.

Diagnostic immunologique

Les techniques de détection des anticorps Elles sont détaillées dans le "Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE", où le test sérologique prescrit pour les échanges internationaux et commerciaux est le test de neutralisation virale (VNT) [98, 136]. Toutefois, la VNT est remplacée au profit de la technique ELISA mieux adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Les c-ELISA sont les plus largement utilisés et sont basés sur le principe de compétition avec un anticorps monoclonal (Mab) anti-N [93] ou anti-H [8]. Ces deux tests sont disponibles dans le commerce. Toutefois, d'autres tests ELISA, c-ELISA [153] ou ELISA indirect [13], ont été développés. Tous ces tests permettent de déterminer le statut sérologique pour PPR des espèces sensibles ou susceptibles de faire une séroconversion, mais ne permettent pas de faire la distinction entre animaux vaccinés et animaux infectés.

Les techniques de détection de l'antigène. Plusieurs outils ont été développés, permettant la détection directe du PPRV dans les échantillons de tissus ou d'écouvillons avec une bonne spécificité et une sensibilité élevée. Un des premiers tests développés à partir de Mabs spécifiques est l'immunocapture ELISA [91], une méthode de choix et une alternative à l'isolement du virus. En outre, la mise en œuvre rapide de ce test, combinée à sa simplicité, a permis son utilisation en routine dans les pays avec un minimum d'infrastructure. Il est basé sur la détection de la protéine N qui est la plus abondante ; sa limite de détection est comparable à celle des techniques de diagnostic moléculaire actuelles (par exemple 100 TCID₅₀). Un test similaire a été développé plus récemment [153]. Un autre test reposant sur le principe de l'immunochromatographie a été développé pour la détection d'antigène du PPRV dans les prélèvements oculaires et est utilisable au pied de l'animal [28]. Un test d'hémagglutination utilisant les globules rouges de poulet a également été développé [55].

Diagnostic moléculaire

Une reverse transcription associée à une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) pour amplifier l'acide nucléique PPRV a été développée dans le milieu les années 90. Elle demeure un outil important de diagnostic pour identifier avec certitude le virus et effectuer

la caractérisation phylogénétique des isolats. Les gènes N et F sont utilisés comme cibles de la RT-PCR conventionnelle [36, 56]. La RT-PCR est également applicable directement aux échantillons prélevés sur un papier filtre et stockées en l'absence d'une chaîne de froid [103]. Les protocoles pour la RT-PCR quantitative (qRT-PCR) pour le diagnostic de la peste des petits ruminants ont été largement publiés [16, 22, 82]. La PCR LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) a également été mise au point pour l'identification du PPRV [90], technique qui peut être appliquée sur le terrain.

Isolement du virus

Même si le diagnostic de la maladie a été considérablement amélioré avec le développement de l'ELISA et les technologies de détection des acides nucléiques, l'isolement de l'agent doit rester primordial et être mis en œuvre dès que possible. Pour l'isolement du PPRV, les échantillons devraient idéalement être prélevés pendant la phase précoce de la maladie (c'est à dire la phase prodromale ou phases érosive) ou sur des carcasses fraîches. Les échantillons pathologiques les plus appropriés pour l'isolement du PPRV sont les écouvillons nasaux et oculaires, les poumons et les ganglions lymphatiques, mais d'autres tissus tels que l'intestin ou les globules blancs peuvent également être utilisés. Les explants primaires et secondaires de cellules de rein de mouton ou de veau ont été utilisés pendant de nombreuses années pour l'isolement du PPRV [87]. Par la suite, des lignées cellulaires, faciles à maintenir en culture et exemptes des inconvénients liés à la disponibilité et la qualité des cellules primaires ont ensuite été utilisées. Les lignées de rein de singe vert africain (Vero) sont les plus couramment utilisées pour l'isolement du PPRV [65, 87]. Cependant, plusieurs passages à l'aveugle sont nécessaires avant l'apparition d'effets cytopathiques [139]. Pour améliorer l'efficacité de l'isolement du virus, une lignée de cellules de singe exprimant le récepteur du PPRV a été développée[5]). Avec cette lignée cellulaire modifiée, le PPRV peut maintenant être isolé en moins d'une semaine.

2.1.9 Epidémiologie – Hôtes – Transmission

La PPR est une maladie contagieuse, se propageant rapidement. Les moutons et les chèvres sont les principaux hôtes de PPRV ainsi que les espèces de petits ruminants sauvages [15]. La transmission de PPRV de chèvres infectées aux bovins a été récemment rapportée [88]. De même la détection de l'antigène PPRV chez le lion [11] ainsi que des signes cliniques aigus chez les dromadaires ont été signalés [76]. Le potentiel adaptatif du PPRV catalysé par l'éradication de la peste bovine pourrait favoriser l'émergence de nouveaux hôtes, notamment une émergence potentielle chez le bovin [88, 40, 11] (Figure2.7).

Les sources de contamination sont les différentes excréments des animaux malades, les sécrétions nasales et oculaires, la salive, les matières fécales et l'urine [1, 61]. Les animaux infectés peuvent excréter le virus au moins 3 jours avant le début de la maladie [35]. Comme le PPRV est un virus très fragile, étant rapidement inactivé à température tropicale par les UV solaires et par la dessiccation, la transmission requiert un contact étroit entre l'animal infecté et naïf.

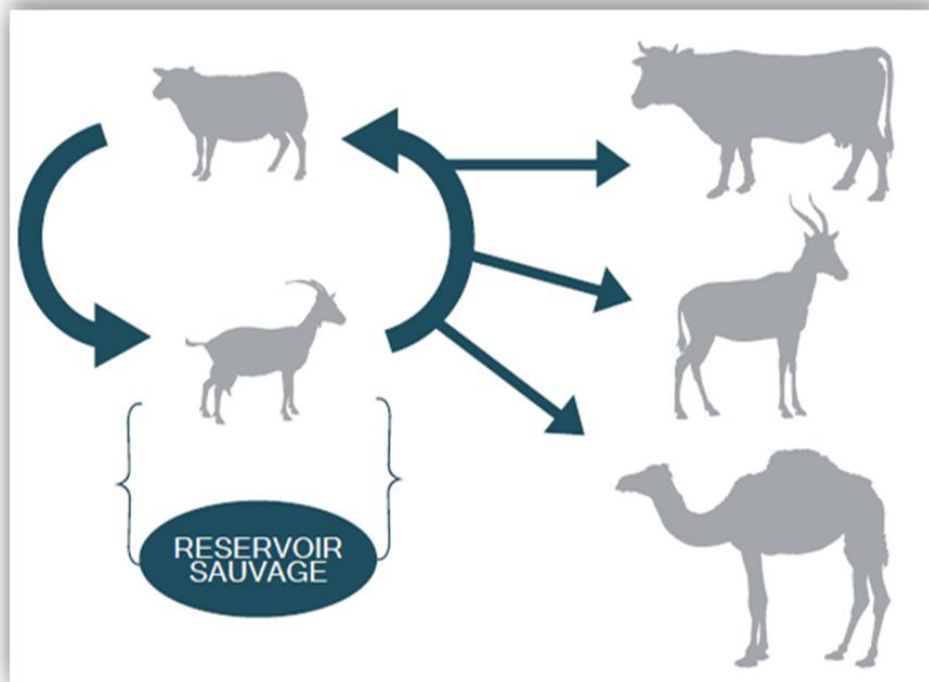


FIGURE 2.7 – Cycle épidémiologique PPR. Le circuit de contagion se déroule au sein des populations d’ovins et de caprins. Les bovins, les cervidés et les dromadaires constitueraient un cul-de-sac épidémiologique pour la PPR. La faune sauvage pourrait jouer un rôle dans la transmission du virus aux animaux domestiques

Les conditions sont idéalement réunies sur les marchés d’animaux vivants où des animaux apparemment sains (mais qui en fait excrètent le virus) sont sources de contamination et de diffusion de la maladie. C’est pourquoi dans les pays endémiques musulmans, des pics de foyers de PPR sont enregistrés juste après la fête religieuse de l’Aïd au cours de laquelle le commerce du mouton augmente de façon spectaculaire. En Afrique subsaharienne, une autre période à haute fréquence de foyers de PPR est la saison froide (Décembre-Février), en raison d’une meilleure conservation du virus dans des conditions d’hivernage et peut être de la tendance qu’ont les animaux à se blottir les uns aux autres pour garder leur chaleur [3, 86]. Dans les pays endémiques, les foyers de PPR dans une même zone se produisent par cycles de trois ans. Cela est dû au fait que les animaux qui guérissent de la PPR sont protégés à vie et que le virus ne peut se maintenir dans les populations de petits ruminants qu’à travers de nouveaux hôtes sensibles (nouveau-nés, animaux naïfs des troupeaux transhumants et des animaux nouvellement achetés). Prenant en considération le fait que le renouvellement des troupeaux de petits ruminants est de 100% tous les 3 ans, une population sensible à la transmission du virus est régénérée après 2-3 ans.

2.1.10 Moyens de lutte

Prophylaxie Sanitaire

La peste des petits ruminants est une maladie de la liste du code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE, et les pays sont tenus de déclarer la maladie auprès de l'OIE selon les conditions énoncées dans ce code. Les mesures de prophylaxie sanitaire sont indiquées dans le chapitre 7.6 du code. Ces mesures concernent aussi bien les pays indemnes que les pays infectés par la PPR.

Lorsque la maladie apparaît dans une zone antérieurement indemne avec des flambées épizootiques, une identification rapide du virus doit être réalisée, les animaux malades et ceux en contact doivent être abattus en prenant en compte des contraintes liées au bien-être animal, et leurs carcasses doivent être brûlées ou enterrées. Des quarantaines strictes et les contrôles des mouvements animaux doivent être appliqués. La désinfection peut se faire par des agents chimiques de pH<4 ou >11 dans les zones contaminées, et le nettoyage des vêtements et de tous les équipements de la ferme par des détergents dont la plupart sont actifs sur PPRV. Une vaccination péri-focale stratégique des animaux à haut risque peut être mise en place ainsi qu'un suivi des animaux sauvages et en captivité.

Lorsque la maladie réapparaît dans une zone endémique, le moyen de contrôle le plus couramment utilisé est la vaccination d'urgence. Les ovins et caprins vaccinés avec une souche atténuée de PPR ou rétablis de la PPR développent une immunité à vie contre la maladie. Un suivi des animaux sauvages et en captivité doit être mis en place afin d'éviter le contact avec les moutons et les chèvres domestiques. La vaccination préventive des espèces zoologiques peut être envisagée. Dans tous les cas, les animaux exposés ou infectés doivent être abattus et les carcasses doivent être brûlées ou enterrées profondément.

Prophylaxie médicale

La Vaccination En raison de son importance épidémiologique et économique dans de nombreux pays, la PPR, est devenue après la peste bovine, une des priorités pour les organisations internationales comme la FAO, et l'OIE en termes de contrôle et d'éradication. Des vaccins homologues PPR très efficaces ont été développés et sont désormais produits, pour ce qui est de l'Afrique, par 12 laboratoires producteurs de vaccins [43, 45, 144]. De nouveaux vaccins sont en développement, essentiellement pour répondre à la question de la thermostabilité en conditions tropicales et à la question du marquage antigénique du vaccin pour différencier animaux infectés des animaux vaccinés (vaccins DIVA). Ainsi, pour produire un vaccin recombinant thermostable protégeant à la fois contre la PPR et la variole caprine, deux maladies d'importances économiques et ayant les mêmes répartitions géographiques, les gènes des protéines F et H de PPRV ont été insérés dans le génome du virus capripox [23, 32]. Même s'il n'est pas encore validé pour une utilisation sur le terrain, ce vaccin capripox recombinant peut être considéré comme efficace, thermostable et DIVA puisque les tests de criblage sérolo-

giques peuvent se baser sur la détection d'anticorps anti-N. Ce type de vaccin est de nature à améliorer l'efficacité des programmes de contrôle de la PPR et notamment à en réduire la durée et donc les coûts pour parvenir à l'éradication.

2.2 Répartition géographique

L'ensemble des souches de PPRV identifiées par différents laboratoires se répartissent en quatre lignées phylogénétiques nommées de I à IV selon des données de séquences provenant des gènes de la nucléoprotéine N [83] ou de la protéine de fusion F [41]. La carte phylogéographique (Figure 2.8) est dérivée de la séquence génique partielle N des différents isolats caractérisés à ce jour. La lignée I est le groupe de souches de virus retrouvé en Afrique de l'Ouest où la maladie a été identifiée pour la première fois (Côte d'Ivoire) et également où le premier isolement du virus a été réalisé (Sénégal). La lignée II est formée par un groupe de virus qui ont été initialement identifiés au Nigeria. La lignée III, qui a été identifiée pour la première fois en Afrique de l'Est, est partagée entre l'Afrique et le Moyen-Orient des deux côtés de la mer Rouge. La lignée IV est une lignée habituellement retrouvée en Asie. Elle couvre une grande surface de la Turquie à l'Asie du Sud en passant par la péninsule arabique. Les échantillons biologiques soumis aux laboratoires de référence, montrent que les récentes émergences du PPRV sont accompagnées par de profonds changements dans la répartition initiale des génotypes viraux. Cela justifie de la nécessité d'une mise à jour constante des données virales grâce à des enquêtes épidémiologiques systématiques. Pour exemple, dans une période de temps étonnamment courte, la lignée IV est devenue la lignée prédominante de la région centrale du continent africain, présente du Soudan au Golf de Guinée jusqu'à la mer Méditerranée [80]. Un tel scénario invasif est également observé dans l'ouest africain, Sénégal et Mauritanie, mais impliquant cette fois la lignée II en provenance de l'Afrique centrale, notamment du Nigeria où elle fut détectée pour la première fois où elle est longtemps restée centrée. Cette lignée semble remplacer ou coexister avec la lignée I du virus qui était la seule détectée jusque-là dans cette région, du Sénégal à la Côte d'Ivoire.

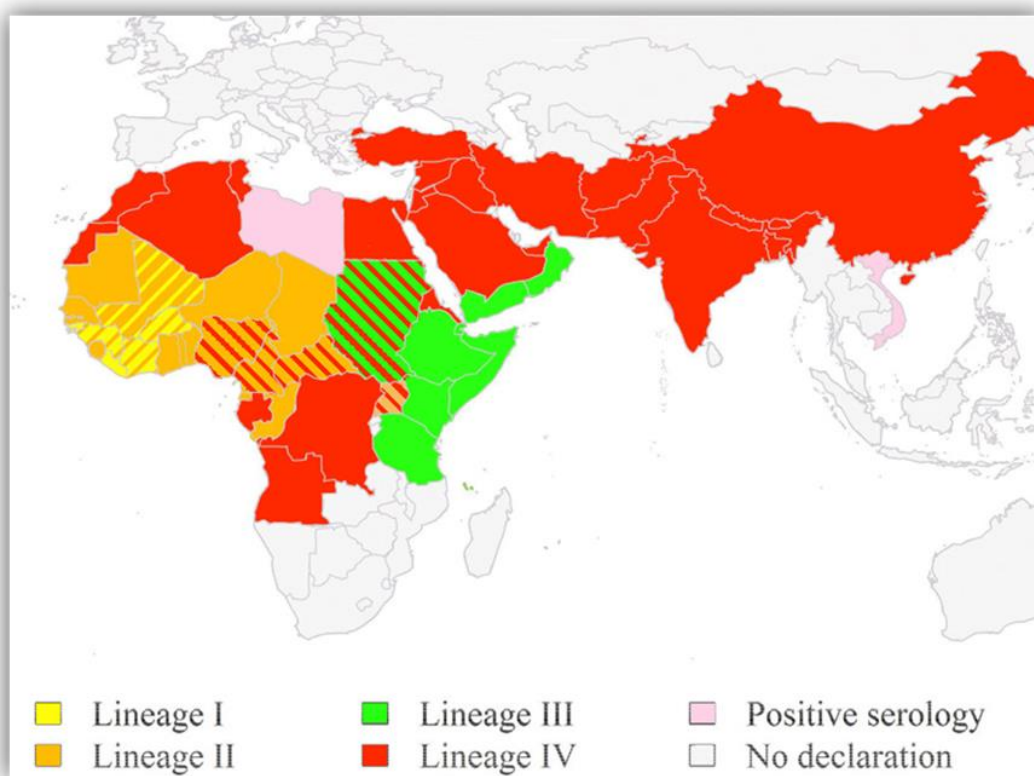


FIGURE 2.8 – Distribution mondiale des quatre lignées du virus de la peste des petits ruminants (PPRV). Les pays déclarant au moins une lignée de PPRV sont colorés selon les lignées identifiées. La couleur de fond et de barres de couleur représentent les dernières lignées recensées dans le pays. Adapté de Albina et al., 2013 [7]

2.3 Filière petits ruminants en Afrique de l'Ouest

L'élevage joue un rôle central dans l'économie des pays ouest-africains avec une contribution au PIB agricole allant parfois jusqu'à 44%. Avec plus de 60 millions de têtes de bovins et 225 millions de petits ruminants, l'Afrique de l'Ouest s'illustre comme une région d'élevage importante [72].

Au Sénégal, la population ovine est constituée de diverses races qui semblent résistantes à la PPR. Les races majoritaires sont les « Peul-peul, Warale et Touabire » présentes dans toute la zone sahélienne et sahélo-soudanaise, dans le centre et le nord du pays. Le Djallonké est une race trypanotolérante qui peuple en grande partie le Sud et l'Est du Sénégal [124]. Deux races constituent la population caprine, la chèvre du Sahel et la chèvre du Fouta Djallon (Djallonké ou encore chèvre naine). Toutes les deux sont sensibles à la PPR mais l'on note une sensibilité très marquée chez la chèvre naine [47]. Dans chaque espèce de petits ruminants il existe un métissage important qui se fait de façon anarchique [114].

Deux principaux systèmes d'élevage coexistent au Sénégal, l'élevage à dominante pastorale et l'élevage agropastoral. L'élevage pastoral ou sylvo-pastoral est caractérisé par son mode extensif, il est localisé dans la zone sahélienne, notamment le Ferlo [127], cette zone caractérisée par une faible pluviosité, une brièveté de la saison des pluies, et une profondeur de la nappe phréatique rendant difficile l'agriculture sous pluie et les installations permanentes. Les éleveurs de l'ethnie Peulh, majoritaires dans cette région vivent en campements dispersés et pratiquent souvent la transhumance pour optimiser la mise en valeur d'espaces arides. Cette transhumance nationale va consister en une migration saisonnière comprenant deux phases. La saison des pluies où les troupeaux et leurs bergers se dispersent dans le Ferlo grâce à la multiplication des points d'eau temporaires qui leur permettent d'exploiter les pâturages les plus reculés. La saison sèche, où au contraire, pasteurs et troupeaux se regroupent progressivement autour des forages, puis se replient sur la périphérie du Ferlo, soit en direction de la vallée du Sénégal, soit vers l'ouest et le sud où le Bassin arachidier leur offre les pâturages des jachères, les puits des villages et surtout les débouchés vers les marchés ruraux et hebdomadaires.

Il existe toute fois une importante mobilité pastorale transfrontalière au Ferlo en provenance de la Mauritanie et du Mali voisins. Le développement de cette transhumance est à l'origine de nombreux conflits interétatiques, à cause d'une part de la surcharge des pâturages qu'elle entraîne et d'autre part du non respect des mesures sanitaires conclues dans les accords bilatéraux entre le Sénégal et ses voisins [155].

La deuxième forme d'élevage est qualifiée d'élevage "agropastoral" caractérisée par l'association des activités d'agriculture et d'élevage au sein des mêmes unités de production. En fonction de la pluviométrie locale et des pratiques agricoles, ces systèmes peuvent être scindés en trois groupes ; les systèmes agro-pastoraux Nord sahéliens à pastoralisme dominant localisés dans la zone fleuve (haute et moyenne vallée) et dans la zone sylvo-pastorale ; les systèmes agro-pastoraux sahéliens à agriculture sèche localisés dans la zone des Niayes et du Centre Nord Bassin Arachidier et agro-pastoraux sahéliens à agriculture humide (Centre

Chapitre 2. Synthèse bibliographique

Sud Bassin Arachidier) ; et enfin les systèmes agro-pastoraux soudaniens localisés concernent les zones du Sénégal Oriental/Haute Casamance, Basse et Moyenne Casamance [46]. Outre ces deux systèmes, il existe aussi un élevage "ovin villageois et urbain" et un élevage dit "de chèvres en divagation".

"L'élevage ovin villageois et urbain" représente une composante très importante. Dans la capitale du Sénégal et ses environs, les effectifs de petits ruminants étaient estimés à 295 500 têtes en 2005 selon les rapports de la direction de l'élevage (DIREL) [30]. Dans les différents quartiers de Dakar les ovins représentaient près de 45% des concessions en 1995 [105]. "L'élevage de chèvres en divagation" est un système très rudimentaire, où les chèvres ne reçoivent pas de compléments alimentaires en saison sèche ni de soins sanitaires, et ne bénéficient parfois pas d'infrastructure adéquate.

Les circuits nationaux de commercialisation des petits ruminants convergent généralement vers la capitale Dakar. Le marché de Dahra joue un rôle de collecteur des petits ruminants provenant des bassins de production Nord du pays et les redistribue vers d'autres marchés importants de consommation comme Saint-Louis, Touba, Kaolack ou encore Thiès. Les animaux du Sud et de l'Est du pays sont acheminés à Dakar via la route nationale 1 et le chemin de fer [30] (Figure 2.9).

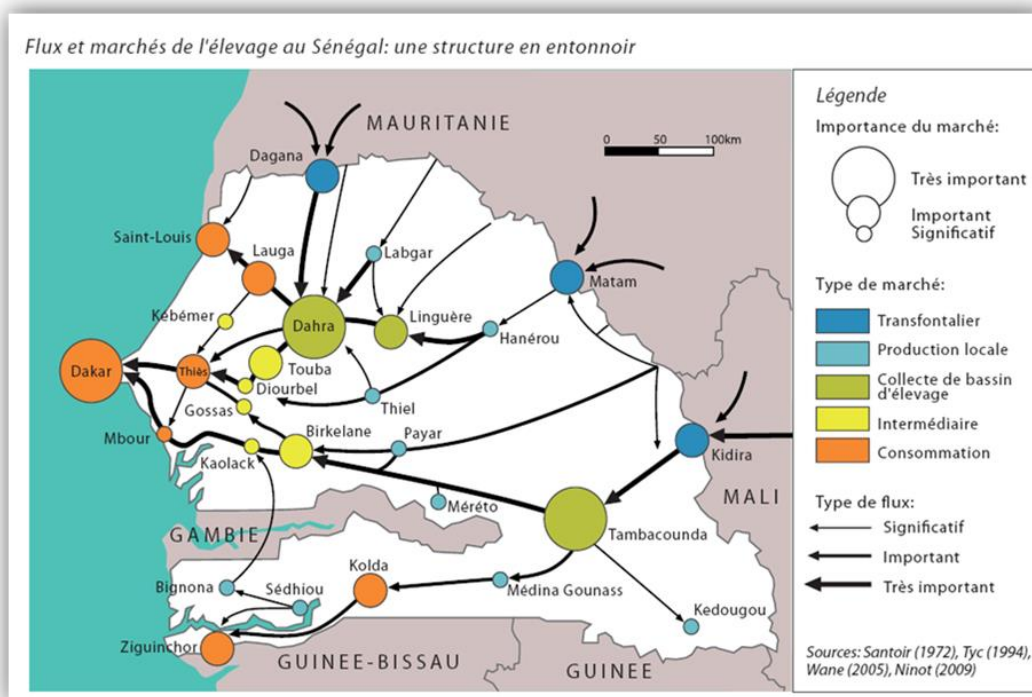


FIGURE 2.9 – Flux et marchés de l'élevage au Sénégal [30]

Les circuits régionaux de commercialisation de bovins et de petits ruminants sont identiques en Afrique de l'ouest et du centre. La géographie des flux animaux est corrélée aux gradients

2.3. Filière petits ruminants en Afrique de l'Ouest

écologiques et au niveau de développement des pays. Les régions chaudes approvisionnent les zones de plantations forestières plus riches en suivant une direction dominante Nord / Sud intérieur/ littoral [96]. Dans le sous espace ouest africain, le Mali constitue le principal pourvoyeur de ce marché en animaux sur pied, même si on note des transactions de petits ruminants, notamment des ovins entre la Mauritanie et le Sénégal (Figure 2.10).

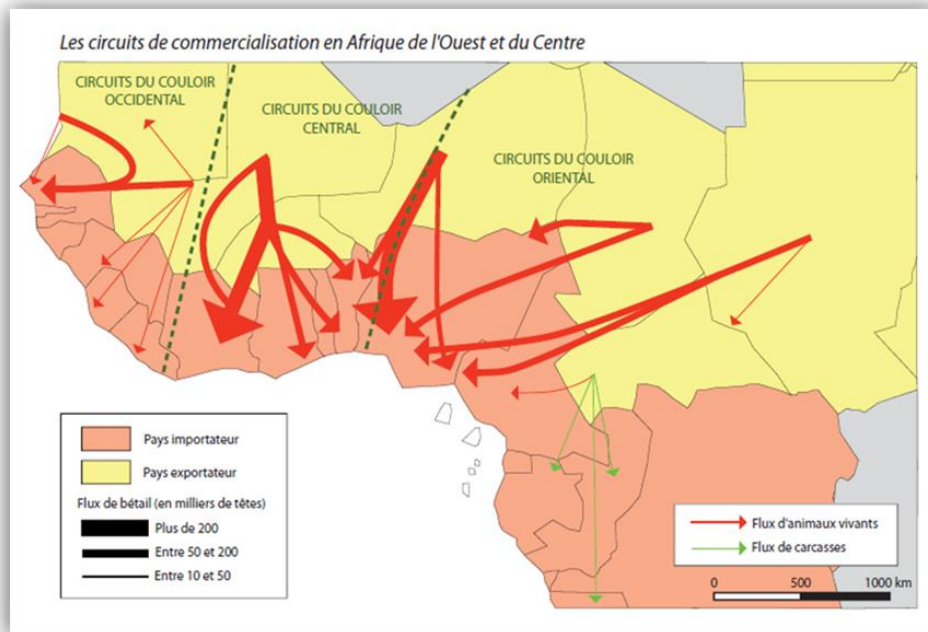


FIGURE 2.10 – Cartographie des circuits régionaux de commercialisation [63]

2.4 Epidémiologie et contrôle de la PPR en Afrique de l'Ouest

2.4.1 Surveillance épidémiologique en Afrique de l'Ouest

Pour faire face au risque de prolifération des maladies animales transfrontalières au sein des communautés économiques africaines, le programme panafricain de contrôle des épizooties (PACE) a participé à la mise en place des réseaux d'épidémiologie des maladies animales dans 30 pays [121]. Avec la fin des activités du PACE, les réseaux nationaux d'épidémiologie en Afrique de l'Ouest et du Centre ont perdu un soutien technique et financier d'importance. Sous l'égide de l'unité régionale de la FAO ECTAD à Bamako, deux réseaux ont vu le jour. Le réseau régional réunissant les réseaux nationaux nommé « RESEPI », avec pour objectifs d'harmoniser les mesures prises au niveau national et de surveiller les maladies animales au niveau régional. Le RESEPI servirait de tribune d'échanges d'informations entre pays limitrophes et contribuerait à la mise en place de programmes régionaux de lutte et de contrôle des maladies prioritaires. Le réseau régional des laboratoires vétérinaires de diagnostic (RESOLAB) a pour but de soutenir les activités de surveillance et de vigilance, et de renforcer la relation entre laboratoires de diagnostic et réseaux d'épidémiologie. La peste des petits ruminants fait partie des maladies animales transfrontalières les plus surveillées en Afrique subsaharienne. Elle est classée prioritaire par tous les réseaux de surveillance et de diagnostic vétérinaire en Afrique (Tableau 2.4).

TABLE 2.4 – Réseaux d'épidémiologie et de maladies surveillées en Afrique de l'Ouest et du Centre [121]

Réseau de surveillance épidémiologique	Maladies surveillées																
	PB	PPCB	PPR	FA	IA	PPA	NC	DNB	FVR	TRY	TUB	CB	CS	B	PE	PPCC	P
Burkina Faso	1	1	1	1	1	1											6
Cameroun	1	1	1	1	1	1	1										7
Côte d'Ivoire	1	1	1	1	1	1	1	1									8
Guinée	1	1	1	1	1												5
RCA	1	1	1							1				1			5
RD Congo	1	1	1	1	1	1											6
Sénégal	1	1	1	1	1	1	1	1	1						1		10
Tchad	1	1	1	1	1		1		1		1	1	1			1	12
Togo	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1				12
Total	9	9	9	8	8	6	5	3	2	2	2	2	2	1	1	1	71

B : babésiose	NC : maladie de Newcastle	PPA : peste TUB : tuberculose
DNB : dermatose nodulaire contagieuse bovine	PB : peste bovine	PPCB : péri CB : fièvre charbonneuse
FA : fièvre aphteuse	PE : peste équine	PPR : peste CS : charbon symptomatique
IA : influenza aviaire	P : pasteurellose	PPCC : pleuropneumonie contagieuse caprine

2.4.2 Contrôle de la PPR en Afrique de l'Ouest

Après l'éradication mondiale de la peste bovine, les organisations internationales ont mobilisé des ressources pour le contrôle progressif de la peste des petits ruminants (PPR) et d'autres maladies animales transfrontières (MAT). Le Bureau interafricain des ressources animales UA-BIRA, le Centre panafricain de vaccins vétérinaires (PANVAC) de l'Union africaine, l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Institut international de recherche sur l'élevage (ILRI), ont organisé des campagnes de vaccination de masse contre la PPR dans 15 pays (Côte d'Ivoire, Ethiopie, Gambie, Guinée Bissau, Guinée Conakry, Kenya, Liberia, Mali, Mauritanie, Niger, Sénégal, Sierra Leone, Somalie, Tanzanie et Ouganda). Ces campagnes furent financées par les projets "Vaccins pour le contrôle des Maladies Animales Négligées en Afrique (VACNADA)" et "Intervention d'urgence en faveur de l'élevage pour atténuer la crise alimentaire en Somalie (LEISOM)". Près de 20,3 millions d'ovins et caprins ont été vaccinés à cette occasion.

Laboratoires de production de vaccins Compte tenu de l'énorme défi lié à la distribution du vaccin PPR pour l'éradication mondiale de la maladie qui est présente dans la majorité des pays, l'assurance de l'efficacité du vaccin au moment de son utilisation sera critique. Dans la perspective de poursuivre les efforts de contrôle de la maladie sur le continent et contribuer à leur durabilité, les capacités des laboratoires ont été considérablement améliorées pour la production et la livraison du vaccin contre la PPR. En Afrique, le vaccin PPR est produit par un réseau de 12 laboratoires (Figure 2.11) du secteur public et privé. Soutenus par l'UA-PANVAC, une harmonisation du système d'assurance qualité telle que recommandée par la 10^e conférence des ministres responsables des ressources animales (Entebbe) en mai 2010, est en cours [164].



FIGURE 2.11 – Cartographie des labobatoires producteurs de vaccins PPR en Afrique. Par ordre alphabétique : (1) Botswana Vaccine Institute (2) Laboratoire national vétérinaire, Cameroun (3) Institut de recherches et Elevage pour le développement, Tchad (4) Vaccine and serum research Institute, Egypte (5) National veterinary Institute, Ethiopie (6) Kenya Veterinary Vaccines Production Institute, Kenya (7) Laboratoire central vétérinaire, Mali (8) National Veterinary Research Institute, Nigéria (9) Direction des Laboratoires Vétérinaires, Niger (10) Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires, Sénégal (11) Business Development Officer, Afrique du Sud (12) Central Veterinary Research Laboratory, Soudan. [K. Tounkara et G. Libeau, communications personnelles]

2.4.3 Surveillance de la PPR au Sénégal

Depuis l'arrêt de la vaccination contre la peste bovine, le Sénégal a mis en place un réseau d'épidémiosurveillance des maladies animales. Les systèmes de surveillance varient selon les maladies. En ce qui concerne la PPR, il s'agit d'une surveillance passive se limitant à recueillir les déclarations de suspicion des éleveurs aux services vétérinaires décentralisés. L'ossature du réseau sénégalais est conforme aux recommandations de l'OIE. Toutefois ce réseau à l'instar de la majorité des réseaux de surveillance en Afrique rencontre des problèmes d'animation liés au manque de moyens financiers pour assurer le bon déroulement de leurs activités [138].

2.4.4 Contrôle de la PPR au Sénégal

La PPR est la maladie virale la plus meurtrière au Sénégal et depuis des décennies les rapports annuels des services vétérinaires montrent son allure saisonnière et son caractère endémique. Des campagnes de vaccination annuelles et régulières sont organisées par l'Etat et exécutées par la direction des services vétérinaires (DSV). Cependant leur efficacité est très limitée (atteint rarement 20% des effectifs estimés). Les difficultés se situent à plusieurs niveaux, nombre de doses insuffisantes, manque de coordination des campagnes, réticence des éleveurs à faire vacciner leur troupeau, etc. [138].

2.5 Etat des connaissances sur l'évolution du génome des virus à ARN

Les virus à ARN constituent de bons modèles pour les approches d'épidémiologie moléculaire car ils sont caractérisés par une petite taille génomique allant de 2 kb à 1,2 Mb [131] et par un taux de mutations relativement élevé compris entre 10^{-3} et 10^{-5} mutations par site et par réplication. Ces virus avec une vitesse d'évolution estimée entre 10^{-2} et 10^{-5} substitution par site et par année [51] ont la possibilité de s'adapter facilement aux changements environnementaux et cette grande adaptabilité est souvent à l'origine de l'émergence ou la réémergence de maladies infectieuses dues aux virus à ARN. Ainsi, les Coronavirus et les Influenza virus ont récemment été au cœur de l'actualité avec le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS), la diarrhée épidémique porcine et l'Influenza (grippe) aviaire (AIV) H5N1 hautement pathogène ou encore le nouveau variant H1N1 pandémique.

Les études sur l'évolution moléculaire des virus ont bénéficié de trois développements majeurs : l'augmentation du nombre et de la qualité des séquences virales, l'augmentation de la capacité des outils informatiques et le développement de méthodes de reconstruction phylogénétique basée sur des modèles d'évolution plus sophistiqués et des analyses statistiques modernes renforçant la confiance dans les hypothèses et les résultats générés. Les méthodes de reconstruction phylogénétique basée sur des séquences hétérochrones permettent de calibrer une horloge moléculaire et définissent ainsi une relation entre les distances génétiques et le temps [129]. Ces méthodes peuvent permettre d'estimer la vitesse d'évolution virale ainsi

Chapitre 2. Synthèse bibliographique

que l'âge de l'ancêtre commun le plus récent. La datation de l'ancêtre commun le plus récent permet d'établir l'origine des virus nouvellement apparu dans une région donnée. Ainsi la résolution de la phylogénie des rétrovirus de primates a établi que l'origine du HIV-1 est le SIV présent chez les chimpanzés (SIVcpz), tandis que celle du HIV-2 est le SIVsmm du mangabey enfumé (*Cercocebus atys*) en Afrique de l'Ouest [150]).

La phylogéographie constitue une approche simple prenant en compte les données génétiques et géographiques et cherchant l'historique des événements de migration compatibles avec la phylogénie observée selon le principe de parcimonie [129]. Cette méthode a été utilisée dans la reconstruction de la dynamique d'invasion des virus de la rage aux USA. La vitesse de propagation du virus a été calculée à partir de la corrélation entre les distances spatiales et temporelles [24].

Cependant, chez les Paramyxovirus peu de travaux ont été réalisés pour déterminer comment leurs dynamiques épidémiologiques s'accordent aux modèles phylogénétiques déduits des données de séquences. Des études réalisées sur 3 paramyxovirus, le virus de la maladie de Carré (CDV), le virus des oreillons et celui de la rougeole (MV) ont estimé un taux de changement évolutif compris entre 6,6 et $11,4 \times 10^{-4}$ substitutions par site et par an. La diversité de MV se serait développée chez l'homme dans les 70 dernières années, un épisode assez récent [128].

L'évolution des paramyxovirus n'est pas encore bien résolue, les dernières études phylogénétiques ayant révélé des évolutions contradictoires entre gènes. Ces études ont utilisé des méthodes et des jeux de données variables pour tenter de résoudre les relations évolutives ambiguës au sein de la famille et ensuite examiner les causes de variation de ces signaux phylogénétiques mais sans pour autant résoudre la phylogénie des virus de la famille [99].

Chez les **Morbillivirus**, la relation phylogénétique entre les différents groupes a été établie par Barrett et al, 1993 [21]. Alors qu'on pensait que les deux **morbillivirus** de ruminants seraient relativement les plus proches génétiquement, la réalité moléculaire relate plutôt une parenté génétique plus étroite entre RPV et MV. Aussi, pour faire la lumière sur l'histoire évolutive des Morbillivirus, les approches de coalescence bayésiennes ont été utilisées pour situer la date de spéciation phylogénétique ayant eu lieu entre les virus ancestraux de MV et de RPV. Celle-ci est estimée autour des 11ème - 12ème siècles [128, 58]. L'archaeovirus capable alors d'infecter à la fois l'homme et le bétail devait être responsable de la première peste bovine ou plutôt de la première rougeole [58].

Ces approches ouvrent ainsi de nouvelles perspectives sur les études d'évolution des PPRV [110, 122]. Ainsi, la diversité génétique actuellement observée entre les 4 lignées de PPR est une histoire très contemporaine datant de la moitié du 19ème siècle. En outre, ces études suggèrent que la lignée III actuellement présente en Afrique orientale et dans le sud de la péninsule arabique est peut-être la lignée virale la plus ancienne. Les analyses réalisées par ces auteurs s'appuient sur des séquences du gène N, qui sont les plus abondantes dans GenBank.

2.5. Etat des connaissances sur l'évolution du génome des virus à ARN

Ce gène s'est révélé jusqu'ici être un bon marqueur phylogénétique car porteur de petites séquences variables appropriées. L'analyse phylogénétique des autres gènes de protéines de PPRV, notamment la protéine de la matrice M, la protéine de fusion F, l'hémagglutinine H [12] et la grande protéine L permettent d'observer également une ramification en quatre lignées. Ceci démontre à priori une vitesse d'évolution comparable entre ces gènes.

Cependant, il a été montré récemment chez les **Mononegavirales** que le niveau d'expression du gène, et, par extension, la position dans le génome de chacun des gènes, est un facteur déterminant de l'évolution des protéines. En effet l'évolution sur chaque gène ainsi que l'incidence de la réponse de l'hôte sont liées à l'abondance relative des ARNm [123]. Par ailleurs chez ces virus, il n'y a aucune preuve d'incidence de la recombinaison en tant que facteur d'évolution dans la nature et in vitro.

Notre étude est basée sur l'analyse de l'évolution du gène N et du gène H ainsi que des deux gènes concaténés, gènes traduisant deux protéines bien exprimées chez le virus, l'une structuralement interne et l'autre externe.

La protéine N est la protéine virale majeure ayant des fonctions primordiales dans la répllication et la transcription en association avec la L et la P. Les chances de survie du virus sont fortement associées à cette protéine. La protéine H, en raison de son interaction avec le système immunitaire de l'hôte et à la présence de plusieurs régions hypervariables, est supposée être soit sous sélection négative faible, soit sous sélection positive plus forte que les autres protéines virales [123].

Dans notre étude, l'histoire évolutive des gènes N et H séquencés et concaténés a été entreprise pour connaître l'ampleur de la diversité génétique au cours d'infections naturelles de petits ruminants dans des foyers de PPR récurrents et délimités dans une région donnée, l'ouest africain. Notre démarche consistera à étudier les informations moléculaires des souches virales récoltées, pour savoir si *i)* la diversité génétique observée sur les courts fragments du gène N est utilisable pour définir leur appartenance aux lignées et *ii)* si cette information est suffisante pour retracer les mouvements des hôtes à l'origine de l'introduction de ces souches dans l'ouest africain.

3 Cartographie des souches de PPRV à partir du gène N partiel

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les séquences moléculaires virales d'une partie du gène de la nucléoprotéine pour caractériser les souches de PPRV présentes au Sénégal et dans les pays voisins. Pour rappel, avant le début de nos travaux aucun état des lieux n'avait été réalisé dans la sous-région, la répartition phylogénétique des souches virales ouest-africaines était basée sur de rares données moléculaires disponibles et dont les plus récentes dataient de 1994 [83]. Cette répartition suggérait que la lignée I de PPRV prévalait dans toute la sous-région ouest-africaine. Aussi, pour réaliser un état des lieux assez précis de la situation locorégionale de la PPR, nous proposons à partir de prélèvements de souches récemment récoltées au Sénégal, d'utiliser la variabilité génétique observée sur les 255 pb couramment utilisées pour le diagnostic du gène N, pour cartographier leur circulation dans les pays de la sous-région.

3.1 Zone d'étude

Notre étude a concerné tous les départements du Sénégal, il s'agissait d'un échantillonnage raisonné basé sur le risque. Les enquêtes étaient déclenchées à l'occasion des déclarations de suspicion des chefs de postes vétérinaires aux services vétérinaires centraux du Sénégal. Nous recherchions des foyers actifs de peste des petits ruminants afin de pouvoir isoler le virus ou identifier son génome. Sur les 4 années d'étude, un total de 66 sites a été enquêté sur le territoire sénégalais (Figure 3.1).



FIGURE 3.1 – Géo-localisation des différents sites visités (villages)

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Collecte du matériel biologique

Les enquêtes épidémiologiques

Elles ont été déclenchées sur la base de critères préalablement établis tels que l'emplacement géographique des suspicions de PPR, la composition spécifique des troupeaux et des systèmes d'élevage concernés, les liens avec les marchés de bétail ou les voies de migration connues, la caractérisation des animaux sensibles, les flux (commerce, transhumance) capables d'améliorer la compréhension de la diffusion du virus. Les foyers de PPR signalés aux services vétérinaires ont été enquêtés au cours de quatre années consécutives 2010, 2011, 2012 et 2013.

Le matériel biologique

Le matériel biologique a été recueilli par un système de surveillance et de diagnostic en partenariat avec l'Institut sénégalais de recherche agricole (ISRA-LNERV, Dakar), et avec la collaboration des services vétérinaires nationaux du Sénégal. Des échantillons cliniques récents de PPRV ont été obtenus des laboratoires nationaux des pays proches du Sénégal à savoir la Mauritanie (Centre National d'élevage et des Recherches Vétérinaires de Nouakchott - CNERV),

la Guinée (l'Institut Supérieur des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dalaba et Laboratoire Central vétérinaire Diagnostic de Conakry - LCVD), le Mali (Laboratoire Central vétérinaire de Bamako - LCV), et la Côte d'Ivoire (Laboratoire National d'appui au Développement Agricole de Bingerville - LANADA). Les échantillons cliniques étaient composés d'écouvillons buccaux, nasaux et oculaires. Les échantillons prélevés en post-mortem a concerné des caprins et les ovins en phase aiguë de PPR. Ils étaient composés de poumon, de rate, de ganglions lymphatiques, et de matières fécales. Tous les échantillons prélevés ont été conservés à +4°C durant l'enquête, puis stockés à -80°C à Dakar jusqu'à leur analyse.

3.2.2 Analyses de laboratoire

L'isolement viral

Les cellules utilisées pour l'isolement viral sont des cellules CV1 modifiées pour exprimer le récepteur spécifique du virus de la peste des petits ruminants (récepteur SLAM-goat) (don du Dr Diallo. A)[5]. Elles sont cultivées à 37°C et 5% CO₂ en milieu MEM (Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-Glutamine (Invitrogen) et 1% de gentamicine (Invitrogen).

Les échantillons de poumon (0,5 g) prélevés après autopsie sur des chèvres infectées sont mis en suspension dans 2 ml de milieu MEM et broyés. Ils sont ensuite clarifiés par centrifugation (5 000 g, 3 min, +4°C).

Des cellules CHS de 24h et à 80% de confluence, réparties en boîte de culture de 25 cm² (T25), sont mises en contact pendant 1 heure à 37°C et 5% CO₂ avec 2 ml de la solution d'échantillon. Après incubation, l'inoculum est retiré et les cellules sont recouvertes avec du milieu complet et remises à l'étuve à 37°C et 5% CO₂ jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique (ECP). A environ 80% d'ECP, le virus est récolté. Le flacon de culture est soumis à trois cycles de congélation (-70°C) et décongélation (37°C). Cellules et surnageant sont récoltés et centrifugés 10 minutes à 1 500 tours par minute à (+ 4°C). Le virus est réparti en fractions aliquotes et stocké à - 70°C.

La détection moléculaire et le séquençage partiel du gène de la nucléoprotéine

Pour identifier les échantillons positifs, une partie des aliquotes (écouvillons ou homogénats de tissus) a été analysée par Real-time RT-PCR. Cette technique nous a permis d'estimer la charge virale de nos échantillons. Les plus « chargés » ont été soumis à une RT-PCR classique utilisant un couple amorces spécifiques NP3 et NP4 situées à l'extrémité 3' du gène N [36].

L'ARN viral a tout d'abord été extrait à l'aide du kit "Viral DNA/RNA isolation" (Macherey-Nagel) selon les indications du fournisseur. Ensuite, une RT-PCR a été réalisée avec chaque couple d'amorce au moyen du Kit One Step RT-PCR de Qiagen selon les cycles d'amplification suivant : un cycle de 30 minutes à 50°C permettant la transcription inverse des ARN viraux,

Chapitre 3. Cartographie des souches de PPRV à partir du gène N partiel

un cycle de 15 minutes à 95°C permettant la dénaturation des ADNc générés, puis 40 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C. La taille des fragments amplifiés a été contrôlée après migration électrophorétique dans un gel d'agarose à 1,5% en TAE 1X et visualisation par illumination au rayonnement UV. Les produits d'amplification d'une taille d'environ 350 pb ont alors été purifiés après migration électrophorétique dans un gel d'agarose à l'aide du Kit QIAquick Gel de Qiagen.

Le séquençage de chacun des deux brins d'ADN des produits d'amplification a ensuite été réalisé par la méthode de Sanger par la société Beckman Coulter Genomics. L'analyse des séquences générées a été réalisée au moyen du logiciel Geneious version 6.1.6 (Biomatters <http://www.geneious.com/>).

Le logiciel MEGA 6 [158] a permis de réaliser les alignements multiples du gène N sur 255 nucléotides. Les séquences d'acides nucléiques du gène N ont tout d'abord été triées par rapport au lieu de collecte pour éviter les doublons. Ces séquences ont ensuite été alignées avec d'autres séquences de PPRV et une séquence de CDV considérée comme externe au groupe ; ces séquences ont été récupérées dans Genbank pour constituer notre jeu de données.

Le modèle d'évolution de séquences proposé par le programme jModelTest2 [37] sous le critère d'information d'Akaike corrigé AICc était un modèle à six paramètres TN93 + I avec 5 catégories pour la distribution gamma. A partir de ce modèle, nous avons effectué des reconstructions moléculaires par maximum de vraisemblance pour tenter de discriminer les souches circulantes. Les arbres ont donc été construits à l'aide du logiciel MEGA 6 avec un ré-échantillonnage de 1000 (bootstraps).

3.2.3 Analyse des séquences et détermination de la lignée géographique

L'analyse des séquences a été réalisée à partir de 61 séquences nucléotidiques de PPRV et d'une séquence de CDV. On y retrouve comme souches récemment récoltées : 23 souches provenant du Sénégal, 2 de Mauritanie, 2 de Guinée, 3 du Mali, et 1 de Côte d'Ivoire. Le tableau 3.1 donne le détail des souches utilisées pour cette analyse phylogénétique (numéro d'accession Genbank, origine, année de collecte, etc.).

TABLE 3.1 – Séquences PPR utilisées pour l'analyse phylogénétique

n°	Sequence name	Accession number	Full name	Country	Lineage
1	CI_2009		Cote d'ivoire 2009	Côte d'Ivoire	II
2	Bhopal03_2003	FJ750560		Inde	IV
3	Burkina_1988	DQ840172			I
4	China_Tibet_Geg_2007	FJ905304		Chine	IV
5	Dorcas_1987	DQ840169		Oman	III
6	Ethiopia_1994	DQ840175		Ethiopie	III
7	Ghana_1978	DQ840167			II
8	GuDa1IV_2013		Guinée Dalaba 1	Guinée	II
9	Guinea_1988	DQ840170			I
10	GuineaBissau_1989	DQ840171			I
11	Guj_2007	JN632532		Inde	IV
12	GukalV_2013		Guinée Kaala	GuinéeKa	II
13	ICV89_1989	DQ840199		Côte d'Ivoire	I
14	Jhansi03_2003	EU344738		Inde	IV
15	CDV_N_gene	JN381190		China	0
16	MaKo1I_2014		Mali Kolondieba 1 2014	Mali	II
17	MaKo2I_2014		Mali Kolondieba 2 2014	Mali	II
18	MaKo3I_2014		Mali Kolondieba 3 2014	Mali	II
19	Mali1_1999	DQ840194			II
20	MaSa4I_2014		Mali Sagabani 4 2014	Mali	II
21	MaSo1_2014		Mali Sosorona 1 2014	Mali	I
22	Mielik_1972	DQ840159		Soudan	III
23	MrTa4I_2012		Mauritanie Tarza 4 2012	Mauritanie	II
24	MrTa1_2012		Mauritanie Tarza 1 2012	Mauritanie	II
25	Nig76_1_1976	DQ840164		Nigeria	II
26	NMaroc_2008	KC594074	Maroc 2008	Maroc	IV
27	Pradesh_1995	DQ840178		Inde	IV
28	Revati05_2005	FJ750559		Inde	IV
29	Revati06_2006	GU014574		Inde	IV
30	Senegal_1994	DQ840174			I
31	SnDk2I_2012		Senegal Dakar 2 2012	Senegal	II
32	SnDk37I_2013		Senegal Dakar 37 2013	Senegal	II
33	SnDk4I_2012		Senegal Dakar 4 2012	Senegal	II
34	SnDk11I_2013		Senegal Dakar 11 2013	Senegal	II
35	SnDk6I_2012		Senegal Dakar 6 2012	Senegal	II
36	SnFill_2010		Senegal Fissel 2010	Senegal	II
37	SnFo60II_2012		Senegal Foundiougne 60 2012	Senegal	II
38	SnGa1I_2013		Senegal Gasambery 1 2013	Senegal	II
39	SnJoI_2013		Senegal Joal 2013	Senegal	II
40	SnKe1I_2013		Senegal Kedougou 1 2013	Senegal	II
41	SnKe2I_2013		Senegal Kedougou2 2013	Senegal	II
42	SnKm1I_2013		Senegal Komptoum 1 2013	Senegal	II
43	SnKol_2014		Senegal Kolda 2014	Senegal	II
44	SnLo1II_2012		Senegal Louga 2012	Senegal	II
45	SnMa1I_2013		Senegal Matam 1 2013	Senegal	II
46	SnMa2I_2013		Senegal Matam 2 2013	Senegal	II
47	SnMa3I_2013		Senegal Matam 3 2013	Senegal	II
48	SnMb1I_2012		Senegal Mban 1 2012	Senegal	II
49	SnMe1II_2012		Senegal Mecke 1 2012	Senegal	II
50	SnNdlI_2012		Senegal Ndiaffate 2012	Senegal	II
51	SnNga1I_2010		Senegal Ngairing 1 2010	Senegal	II
52	SnNgul_2010		Senegal Nguekhoh 1 2010	Senegal	II
53	SnPal_2013		Senegal Pakour 2013	Senegal	II
54	SnSol_2012		Senegal Soum 2012	Senegal	II
55	SnTa1I_2012		Senegal Tambacounda 1 2012	Senegal	II
56	SnTa1I_2013		Senegal Tambacounda 1 2013	Senegal	II
57	SnTa2I_2013		Senegal Tambacounda 2 2013	Senegal	II
58	SnTal_2014		Senegal Tambacounda 2014	Senegal	II
59	SnVel_2012		Senegal Velingara 2013	Senegal	II
60	SnVsI_2012		Senegal Velor serrere 2012	Senegal	II
61	Tibet_Bharal_2008	JX217850		Chine	IV
62	Turkey00_2000	AJ849636		Turquie	IV

3.3 Résultats

3.3.1 Description des foyers de PPR observés

Nos enquêtes ont été réalisées durant les mois de mars à juin 2010, de février à mai 2012, de janvier à avril 2013, de décembre 2013 et de janvier 2014. En 2010, nous avons identifié un foyer PPR dans le département de Mbour à l'ouest du Sénégal. Les foyers de PPR en 2012, se localisaient dans dix (10) villages de sept (7) départements au Sénégal. En 2013 les foyers PPR étaient localisés dans quatorze (14) villages de dix (10) départements, deux foyers PPR ont été identifiés en 2014. La distribution des troupeaux infectés par année est illustrée dans la figure 3.2.

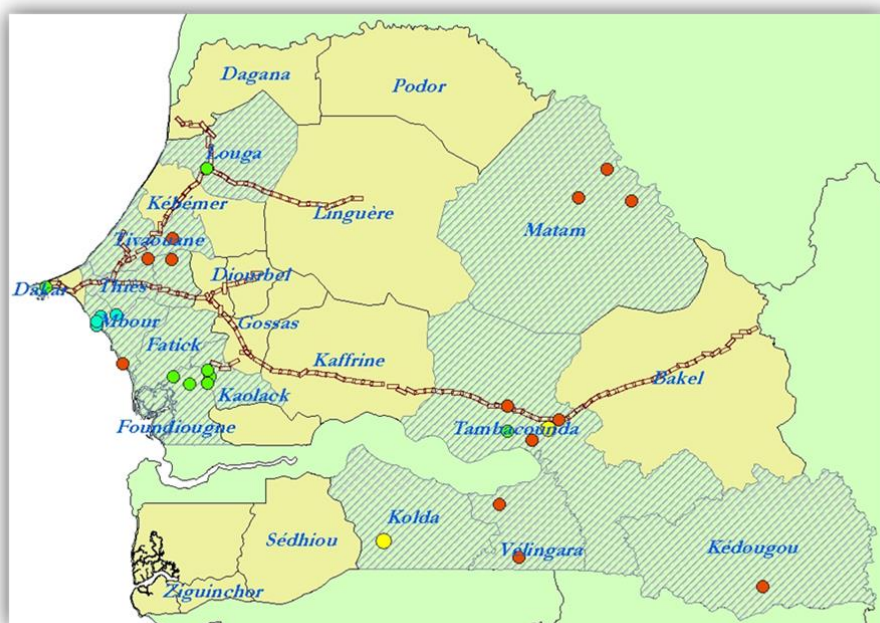


FIGURE 3.2 – Localisation géographique des foyers confirmés de PPR en 2010 (point bleu), 2012 (point vert), 2013 (point orange) et 2014 (point jaune)

3.3.2 Description des signes cliniques rencontrés

Dans les troupeaux suspects, la sélection des animaux à échantillonner s'est faite selon les critères suivants : l'hyperthermie et la morbidité de l'animal associées soit aux larmolements, aux jetages, à une dyspnée, des érosions buccales ou encore à une diarrhée. Chez les femelles gestantes les avortements ont été pris en compte dans le diagnostic clinique de la PPR. Tous ces signes pouvant apparaître indépendamment les uns des autres, il était judicieux de les rassembler à l'échelle du troupeau concerné. Dans le marché de petits ruminants de Dakar (foirail de Pikine), seul le jetage associé à une hyperthermie ont été pris en compte dans la sélection des animaux à prélever.

3.3.3 Isolement du virus à partir d'organes

Pour l'isolement du virus, 15 suspensions virales issues de broyats de poumons ont été utilisées. Seuls 4 virus PPRV ont pu être isolés après deux passages sur cellules CHS. Ces souches sont les suivantes : Senegal Soum 2012, Senegal Louga 1 2012, Senegal Tambacounda 2014, Senegal Kolda 2014. Elles ont été séquencées et analysées avec les autres séquences de PPRV.

3.3.4 Profil électrophorétique des produits PCR

La figure 3.3 présente la visualisation sur gel des produits d'amplification du gène partiel de la nucléoprotéine de PPRV.

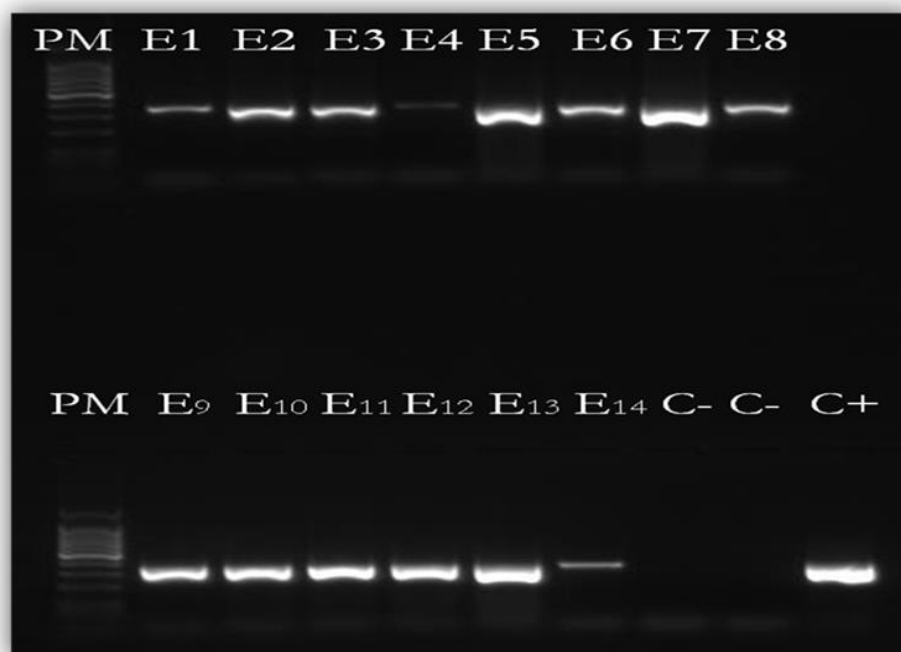


FIGURE 3.3 – Profil électrophorétique des produits PCR

3.3.6 Analyse de l'arbre phylogénétique

La reconstruction phylogénétique par maximum de vraisemblance à partir de courtes séquences de la nucléoprotéine admet une phylogénie présentant les PPRV en quatre lignées distinctes (I, II, III et IV). La séquence du virus de la maladie de Carré (JN381190) représentant le groupe externe (en noir) nous a permis d'enraciner notre arbre. Depuis la racine, se branche en premier lieu la lignée trois III (en orange), puis la lignée I ; par la suite viennent se brancher les lignées IV (en Marron) et II (en vert). Conformément à la répartition phylogéographique précédemment admise, les anciennes souches (date de récolte antérieure à 2008) de lignée I et II sont localisées en Afrique de l'Ouest, du côté du Burkina (1988), de la Guinée (1988), de la Côte d'Ivoire (1989), de la Guinée-Bissau (1989) et du Sénégal (1994) pour la lignée I ; et du côté du Nigéria (1976), du Ghana (1978) et du Mali (1999) pour la lignée II. Les anciennes souches de lignées III se distribuent en Afrique de l'Est, en Ethiopie (1994), au Soudan (1972) et à Oman (1987). Les souches de lignées IV se répartissent en Asie dans des pays comme l'Inde (2003) et la Chine (2008), elles se sont signalées au Nord de l'Afrique à l'occasion de l'épizootie de 2008 au Maroc (Figure 3.4).

Les souches de PPRV récoltées entre 2009 et 2014 au Sénégal (n=38), en Guinée (n=2), en Côte d'Ivoire (n=1), en Mauritanie (n=2) et au Mali (n=5) sont quasiment toutes regroupées dans le clade de lignée II. La classification en lignée II des souches récentes des pays ouest africains (le Mali hébergeait auparavant cette lignée), traduit son émergence au niveau régional, là où la lignée I prévalait. Toutefois notons qu'une souche malienne (MaSoIc-2014) à la différence de tous les autres s'insère dans le clade de lignée I. L'identification de virus de cette lignée marque une réapparition d'un virus qui a été vu pour la dernière fois en 1994 au Sénégal.

L'analyse phylogénétique détaillée de l'arbre classe les souches de PPRV récemment récoltées dans un sous-clade soutenu par le clade des "anciennes souches" de lignée II (Nigéria 1976, Ghana 1978 et Mali 1999) que nous qualifieront ici de clade basal au sous-clade des "nouvelles souches". Les nœuds seront nommés selon les valeurs de bootstraps ; la relation de parenté entre souche sera basée sur l'ordre relatif des nœuds des plus récents au plus anciens. Les souches du Sénégal (en vert clair) auxquelles s'ajoutent les 2 souches de Mauritanie, les 2 de Guinée et 1 du Mali (tous en violet) possèdent un ancêtre commun au nœud 64 (n°64) ; cet ancêtre (n°64) partage avec les souches du Mali (MaKoI II et III) l'ancêtre commun (n°62). Ce dernier ancêtre partage avec la souche de Côte d'Ivoire (CI-2009) l'ancêtre commun (n°81). Cela suggère que les "nouvelles souches" du Sénégal, de la Guinée, de la Mauritanie sont phylogénétiquement plus proches des "nouvelles souches" du Mali que de celui de la Côte d'Ivoire. Cependant les branches partant du nœud (n°64) forment une polytonie apparente marquant une incertitude élevée dans la phylogénie des souches émanant de cet ancêtre commun.

3.4 Discussion

L'échantillonnage raisonné basé sur les déclarations des éleveurs et ou des agents vétérinaires peut générer des données incomplètes. Les foyers de PPR dans les pays endémiques étant rarement déclarés par les éleveurs, ces derniers préférant traiter eux-mêmes leurs animaux. Cela peut constituer une entrave majeure à ce type d'étude. Une enquête longue durée à l'échelle nationale aurait permis d'augmenter la quantité de prélèvements dans le temps. Cependant un tel maillage du territoire implique de grands moyens financiers.

Le matériel biologique de choix dans cette enquête PPR a été les écouvillons (oculaire et nasal) et les poumons. Les écouvillons se conservent facilement sous glace et donnent de bons résultats en PCR quantitative et qualitative par rapport au sang. En plus d'être facilement acceptés par les éleveurs (ne touchant pas à l'intégrité des animaux), les prélèvements sur écouvillons imprégnés dans des tubes contenant du MEM peuvent aussi servir à isoler le virus s'ils sont conservés à -80°C ou à imbiber des papiers buvards pour une longue conservation à température ambiante pour la détection moléculaire. L'efficacité de la conservation de l'ARN viral PPR à long terme a récemment été démontrée par Michaud et al, 2007 [103] ; dans le domaine du diagnostic rapide, ces buvards sont une alternative au transport sous glace des prélèvements biologiques dans les pays en développement.

Les poumons sont faciles à broyer et contiennent des charges virales importantes, ils peuvent être utilisés pour la détection PCR mais surtout pour l'isolement viral, s'ils sont conservés dans de bonnes conditions. En effet, le faible taux de réussite de l'isolement viral (4 sur 15 suspensions virales) résulte sans doute de la conservation du virus sous glace pendant la durée des missions de terrain (7 jours). Le PPRV est un virus fragile, incapable de survivre longtemps en dehors de l'hôte avec une demi-vie estimée à 2,2 minutes à 56°C et à 3,3 heures 18 à 37°C [135]. La conservation du virus sous glace (+4°C) pendant 7 jours de terrain permet sans doute de conserver l'ARN viral à moyen terme mais entame la viabilité du virus PPR. Les prélèvements d'organes ou de sécrétions virales doivent donc être immédiatement conservés dans de l'azote liquide, puis transférés à -80°C au laboratoire.

Historiquement, tous ces pays hébergeaient des souches PPRV de lignée I et le constat que nous faisons aujourd'hui est que la lignée II est prédominante dans l'ouest africain. Il est à noter que la lignée I persiste tout de même dans cette sous-région, dans la mesure où elle vient d'être mise en cause dans les récents foyers de PPR au Mali dans la région de Sikasso. Cette situation suggère un phénomène de compétition entre des souches de différentes lignées. La phylogénie illustrée en figure 3.4 induit l'idée selon laquelle la lignée II remplacerait progressivement la lignée I sur le terrain. Les liens commerciaux étroits entre ces pays semblent être la principale voie de diffusion des souches de lignée II. Nous savons que le Mali exporte en période de fête (aid el fitr) des centaines de milliers de têtes d'ovins vers plusieurs pays dont le Sénégal, la Mauritanie, la Guinée, et la Côte d'Ivoire.

Les résultats phylogénétiques montrent que le diagnostic moléculaire basé sur la variabilité génétique des courtes séquences du gène viral N, permet une bonne définition des souches

virales en lignée cependant, cette variabilité semble être trop limitée lorsqu'il s'agit de retracer la circulation des souches ou de déterminer la filiation entre différentes souches virales de même lignée. En effet notre marqueur polymorphe, situé dans la zone la plus variable du gène N est capable de différencier les lignées virales de PPR les unes des autres, mais ce marqueur devient monomorphe au sein d'une même lignée car les sites de mutations diagnostiques servant à différencier l'espèce sont très réduits. De ce fait la phylogénie évolutive de la PPR à partir de ces courtes séquences n'est pas résolue et la polytonie (multifurcation) observée dans le clade des « nouvelles souches de lignées II » témoigne du manque d'information génétique de notre jeu de données.

4 Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

4.1 Introduction

L'épidémiologie moléculaire des génomes viraux peut permettre d'étudier la diversité génétique des virus dans un environnement donné. L'étude précédente a concerné l'analyse d'un fragment de 255 pb du gène N de 40 souches de virus PPR prélevées au cours de différents foyers au Sénégal, en Guinée, en Côte d'Ivoire, en Mauritanie et au Mali de 2010 à 2014 (Figure 4.1).

Les résultats phylogénétiques ont montré que les virus circulant actuellement dans ces pays de façon enzootique appartiennent dans leur grande majorité à la lignée II. La situation antérieure montrait que cette zone était occupée par la lignée I [148, 83]. Aussi dans cette enquête, nous avons eu l'opportunité d'étudier sur un laps de temps d'environ 4 ans, l'évolution du virus de la lignée II, enzootique et majoritairement représenté dans l'Ouest Africain [52]. Pendant cette période, l'incidence de la PPR au Sénégal d'une façon générale, n'a pas faibli en raison de l'insuffisance des programmes de vaccination.

L'étude fine de l'évolution du virus ne peut se faire à partir de courtes séquences du gène viral N, car si celles-ci permettent une bonne définition des souches virales en lignée, elles ont un potentiel restreint à retracer la circulation de ces souches sur le terrain ou encore à déterminer la filiation entre différentes souches d'une même lignée. Par conséquent, il a été décidé de procéder aux séquençages complets des gènes N et H dans le but d'avoir accès à d'avantage d'information génétique. Ces deux gènes traduisent deux protéines bien exprimées chez les *Morbillivirus*, l'une étant structuralement interne et l'autre externe. La protéine N est la protéine majeure du virus avec des fonctions primordiales dans la réplication et la transcription en association avec la L et la P. La protéine H est la clé d'entrée du virus dans la cellule hôte et un déterminant antigénique majeur des *Mononégavirales*. En raison de son interaction avec le système immunitaire de l'hôte et à la présence de plusieurs régions hypervariables, la protéine H est supposée être soit sous sélection négative faible, soit sous sélection positive plus forte que les autres protéines virales [123].

que dans des séquences conservées des gènes de manière à obtenir des séquences amplifiées chevauchantes (Figure 4.2 et Figure 4.3). Au final, 4 couples d'amorces permettant d'amplifier chaque gène ont été déterminées (Tableau 4.1).

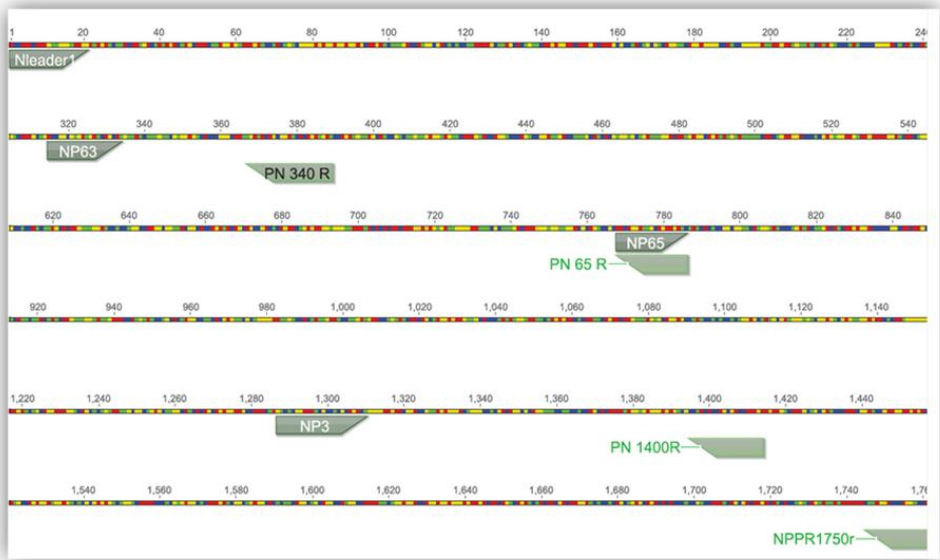


FIGURE 4.2 – Position des couples d'amorces permettant l'amplification du gène N complet

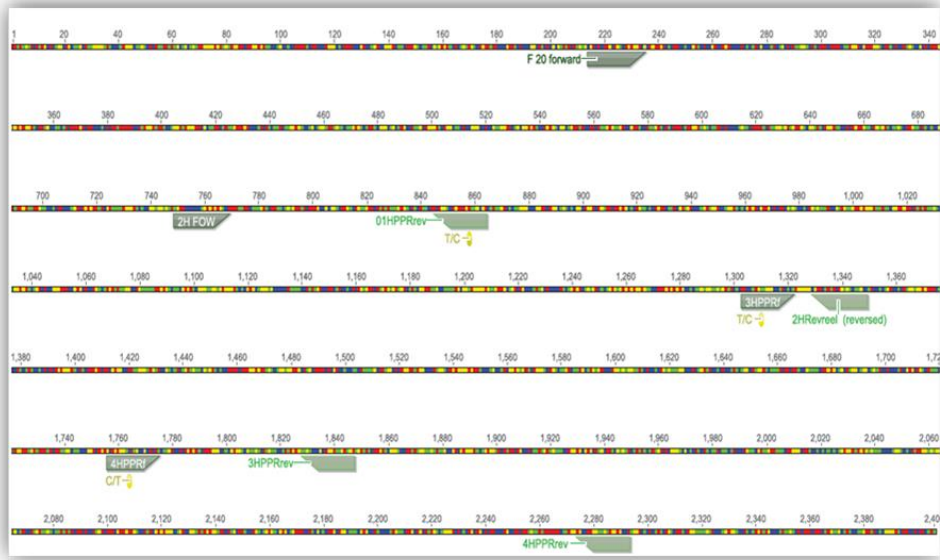


FIGURE 4.3 – Position des couples d'amorces permettant l'amplification du gène H complet

Chapitre 4. Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

TABLE 4.1 – Catalogue d'amorces spécifiques utilisées

Primers	Gene N (Position)	Sequence
Nleader1	PPR-N (1>21)	5'ACCAGACAAAGCTGGGTAAGG 3'
NP63	PPR-N (315>334)	5' ACCGGCGTGATGATCAGCAT 3'
NP65	PPR-N (768>786)	5' AACAGGATTGCAGAAGATC 3'
NP3	PPR-N (1232>1255)	5'GTCTCGGAAATCGCCTCACAGACT 3'
PN340r	PPR-N (367<389)	5' ATCATCTGTGATCCGCTGTATCA 3'
PN65r	PPR-N (768<786)	5' GATCTTCTGCAATCCTGTT 3'
PN1400r	PPR-N (1395<1414)	5' TCTTTGGTCGCTGGTGTAGG 3'
NP4	PPR-N (1560<1583)	5' CCTCCTCCTGGTCCTCCAGAATCT 3'
PN1750r	PPR-N (1745<1764)	5' GCTTGGACCTGGGTCTAAG 3'

Primers	Gene H (Position)	Sequence
F 25 F	PPR-H (7218>7238)	5'CGACACAAGCAGTCAGAGGACG 3'
02HFow	PPR-H (7799>7820)	5' TGAACCCCCCTGAGAGAGTCA 3'
3HPPRF	PPR-H (8298>8317)	5' AACCTAGCTGGGCCTACTCT 3'
4HPPRF	PPR-H (8751>8770)	5' GCAGAGGTTATGCCGCACAT 3'
01HPPRrev	PPR-H (7840<7859)	5' TCGCAACCTTTCTGACCTGT 3'
02Hrevreel	PPR-H (8420<8436)	5' GGCAAGACACTGTATAGTTCG 3'
03HPPRrev	PPR-H (8823<8842)	5'TCATCAATCCTGCGGGACAA 3'
04HPPRrev	PPR-H (9269<9288)	5TGAGTCCATGGCTCCTACAAC 3'

Amplification des gènes

L'ARN viral a tout d'abord été extrait à l'aide du kit "Viral DNA/RNA isolation" (Macherey-Nagel) selon les indications du fournisseur. Ensuite, une RT-PCR a été réalisée avec chaque couple d'amorce au moyen du Kit One-Step RT-PCR de Qiagen selon les cycles d'amplification suivant : un cycle de 30 minutes à 50°C permettant la transcription inverse des ARN viraux, un cycle de 15 minutes à 95°C permettant la dénaturation de l'ADNc généré, puis 40 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 57°C et 1 minute d'élongation à 72°C. La taille des fragments amplifiés a été contrôlée après migration électrophorétique dans un gel d'agarose à 1,5% en TAE 1X et sa visualisation par illumination au rayonnement UV. Les produits d'amplification d'une taille comprise entre 350 et 700 nucléotides selon le couple d'amorce utilisé ont alors été purifiés après migration électrophorétique à l'aide du Kit QIAquick Gel de Qiagen.

Le séquençage de chacun des deux brins d'ADN des produits d'amplification a ensuite été réalisé par la méthode de Sanger par la société Beckman Coulter Genomics. L'analyse des séquences générées a été réalisée au moyen du logiciel Geneious version 6.1.6 (Biomatters <http://www.geneious.com/>). Après vérification des électrophorégrammes, des alignements multiples portant sur 1575 nucléotides pour le gène N et sur 1827 nucléotides pour le gène H ont été réalisés avec le logiciel MEGA 6 [158].

Pour obtenir une estimation de la date de l'ancêtre commun le plus récent (TMRCA) de chacune des lignées, des séquences de virus représentant la lignée II avant l'apparition de celle-ci au Sénégal et des représentants de chacune des autres lignées ont été ajoutés à l'ensemble des données. Pour ce faire, en plus des 40 séquences que nous avons générées, 15 séquences du gène N et 13 séquences du gène H provenant des 4 lignées de virus PPR et disponibles dans Genbank ont été incluses dans les alignements multiples. Par ailleurs un alignement chimérique constitué de la concaténation des alignements multiples de 51 gènes N et 51 gènes H a été réalisé à l'aide du logiciel DNAsp. Cet alignement chimérique est constitué des souches pour lesquelles les séquences complètes des deux gènes étaient disponibles (Tableau 4.2).

Chapitre 4. Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

TABLE 4.2 – Tableau des séquences N, H et NH

Sequence name	Accession numbers	Full name	Country	H	N	N/H	Lineage
CL_2009		Cote d'Ivoire 2009	Côte d'Ivoire	x	x	x	II
Bhopal03_2003	FJ750563, FJ750560		India	x	x	x	IV
China_Tibet_Geg_2007	FJ905304		China	x	x	x	IV
Dorcas_1987	DQ840169		Oman		x		III
Ethiopia_1994	KJ867540	Ethiopia_1994	Ethiopia	x	x	x	III
GuDa1IV_2013		Guinee Dalaba 1	Guinea	x	x	x	II
GuJ_2007	JN632535, JN632532		India	x	x	x	IV
GuKaIV_2013		Guinee Kaala	Guinea	x	x	x	II
ICV89_1989	EU267273		Côte d'Ivoire	x	x	x	I
Jhansi03_2003	GU014573, EU344738		India	x	x	x	IV
MaKo1L_2014		Mali Kolondieba 1 2014	Mali	x	x	x	II
MaKo2L_2014		Mali Kolondieba 2 2014	Mali	x	x	x	II
MaKo3L_2014		Mali Kolondieba 3 2014	Mali	x	x	x	II
MaSa4L_2014		Mali Sagabari 4 2014	Mali	x	x	x	II
Mielik_1972	DQ840159		Sudan		x		III
MrTa4L_2012		Mauritanie Tarza 4 2012	Mauritania	x	x	x	II
MrTaL_2012		Mauritanie Tarza 1 2012	Mauritania	x	x	x	II
Nig76_1_1976	EU267274		Nigeria	x	x	x	II
NMaroc_2008	KC594074	Maroc 2008	Morocco	x	x	x	IV
Pradesh_1995	DQ840178		India		x		IV
Revati05_2005	EU344744, FJ750559		India	x	x	x	IV
Revati06_2006	GU014574		India		x		IV
SnDk2L_2012		Senegal Dakar 2 2012	Senegal	x	x	x	II
SnDk37L_2013		Senegal Dakar 37 2012	Senegal	x	x	x	II
SnDk4L_2012		Senegal Dakar 4 2012	Senegal	x	x	x	II
SnDk6L_2012		Senegal Dakar 6 2012	Senegal	x	x	x	II
SnFill_2010		Senegal Fissel 2010	Senegal	x	x	x	II
SnFo60L_2012		Senegal Foundiougne 60 2012	Senegal	x	x	x	II
SnGa1L_2013		Senegal Gasamby 1 2013	Senegal	x	x	x	II
SnJoL_2013		Senegal Joal 2013	Senegal	x	x	x	II
SnKe1L_2013		Senegal Kedougou 1 2013	Senegal	x	x	x	II
SnKe2L_2013		Senegal Kedougou2 2013	Senegal	x	x	x	II
SnKm1L_2013		Senegal Kompendoum 1 2013	Senegal	x	x	x	II
SnKoL_2014		Senegal Kolda 2014	Senegal	x	x	x	II
SnLo1L_2012		Senegal Louga 1 2012	Senegal	x	x	x	II
SnMa1L_2013		Senegal Matam 1 2013	Senegal	x	x	x	II
SnMa2L_2013		Senegal Matam 2 2013	Senegal	x	x	x	II
SnMa3L_2013		Senegal Matam 3 2013	Senegal	x	x	x	II
SnMb1L_2012		Senegal Mban 1 2012	Senegal	x	x	x	II
SnMe1L_2012		Senegal Mecke 1 2012	Senegal	x	x	x	II
SnNdL_2012		Senegal Ndiaffate 2012	Senegal	x	x	x	II
SnNga1L_2010		Senegal Ngairing 1 2010	Senegal	x	x	x	II
SnNgu3L_2010		Senegal Nguekhoh 3 2010	Senegal	x	x	x	II
SnNgul_2010		Senegal Nguekhoh 1 2010	Senegal	x	x	x	II
SnPal_2013		Senegal Pakour 2013	Senegal	x	x	x	II
SnSol_2012		Senegal Soum 2012	Senegal	x	x	x	II
SnTa1L_2012		Senegal Tambacounda 1 2012	Senegal	x	x	x	II
SnTa1L_2013		Senegal Tambacounda 1 2013	Senegal	x	x	x	II
SnTa2L_2013		Senegal Tambacounda 2 2013	Senegal	x	x	x	II
SnTaL_2014		Senegal Tambacounda 2014	Senegal	x	x	x	II
SnVeL_2012		Senegal Velingara 2013	Senegal	x	x	x	II
SnVsl_2012		Senegal Velor serrere 2012	Senegal	x	x	x	II
Tibet_Bharal_2008	JX217850		China	x	x	x	IV
Turkey00_2000	AJ849636		Turkey	x	x	x	IV
SnDk5L_2013		Senegal Dakar 6 2013		x	x	x	II
SnNgu4L_2010		Senegal Nguekhoh 2010	Senegal	x			II
SnNgu5L_2010		Senegal Nguekhoh 2010	Senegal	x			II
Kurdistan_2011	KF648288		Kurdistan	x			IV
Izatnagar_1994	KF752443	Izatnagar 1994 Indelzat	India	x			IV

Vérification des alignements et validation des jeux de données

Le suréchantillonnage a été évité en supprimant les séquences similaires des virus prélevés dans les mêmes sites et aux mêmes périodes (moins de 1% de divergence nucléotidique). La visualisation des alignements d'acides nucléiques a permis de rechercher d'éventuelles ruptures d'alignements dans les axes vertical et horizontal : elle a été suivie d'une vérification des positions non consensuelles et d'une recherche de motifs potentiellement suspects (retrouvés uniquement dans la lignée II et non retrouvés dans les autres lignées). La traduction de l'alignement sous forme protéique a permis de détecter les codons « stop » inappropriés et les caractères indéterminés. La recherche de doublons et des recombinaisons au sein des différents alignements a été effectuée avec le logiciel DAMBE afin de les soustraire pour ne pas biaiser les analyses phylogénétiques ultérieures, puis la qualité du signal génétique a ensuite été évaluée à l'aide des logiciels MEGA 6 et DNAsp5. Les sites soumis à pression pouvant altérer les analyses phylogénétiques de sélection ainsi que les événements de recombinaison ont été également recherchés avec le logiciel Hyphy 2.2.0. Par la suite, les modèles de substitution les plus en adéquation avec nos différents jeux de données ont été déterminés sur la base du Critère d'information bayésien (BIC) en utilisant les logiciels JModelTest, v2.1.4 [37] et MEGA 6 [158]. Le tableau 4.3 ci-dessous synthétise les résultats de ces analyses.

TABLE 4.3 – Résultats d'analyses des jeux de données

	Alignements N	Alignement H
Signal phylogénétique	Non saturé	Non saturé
Sélection positive	Absente	Absente
Décroissance de la diversité génétique	Lignées III>I>II>IV	Lignées III>I>II>IV
Modèles d'évolution	K2 (2 paramètres)	T92 (3 paramètres)
dN/dS < 1 selon modèle de substitution des codons	dN/dS moyen	dN/dS moyen
Modèle 2 (4 paramètres)	0.114	0.198
Modèle 8 (4 paramètres)	0.121	0.188

4.2.2 Analyse phylogénétique Bayésienne

Analyse des données des gènes partiels N, H et gènes concaténés N/H

L'analyse phylogénétique bayésienne a été réalisée avec le logiciel MrBayes v3.2.2 [134]. Pour des raisons de comparaison, le modèle de substitution réversible généralisé (GTR pour General Time Reversible) [133, 85] a été systématiquement utilisé. Ce modèle est le plus complexe de tous les modèles de reconstructions phylogénétiques avec 9 paramètres (les 3 paramètres de fréquences à l'équilibre et les 6 paramètres d'échangeabilité), les autres modèles proposés étant des cas particuliers de ce modèle. Un total de 100.000.000 d'itérations utilisant deux chaînes de Markov indépendantes et un échantillonnage des arbres toutes les 1000 itérations a été réalisé selon les spécifications décrites dans le tableau 4.4 ci-dessous, c'est-à-dire en employant pour l'un le modèle de reconstruction classique et pour l'autre le modèle de reconstruction par codon.

TABLE 4.4 – Tableaux de reconstructions classique et par codon

reconstruction classique
Lignes de commandes :
lset nst=6 ngammat=5 rates=propinv
prset brlenspr=uncons:gammatdir(1,1,1,1)
mcmc Ngen=100000000 Nchains=2 Samplefreq=1000 Printfreq=100 Diagnfreq=1000

reconstruction par codon
Lignes de commandes :
lset nst=6 nucmodel=codon ngammat=5 rates=propinv
prset brlenspr=uncons:gammatdir(1,1,1,1)
mcmc Ngen=100000000 Nchains=2 Samplefreq=1000 Printfreq=100 Diagnfreq=1000

TABLE 4.5 – Résultats du test de l'horloge moléculaire utilisant la méthode du Maximum de vraisemblance

lnL	Parameters	(+G))	(+I)
Avec Horloge	-33604.539	59	0.498
Sans Horloge	-10786.674	108	0.52

La construction des deux arbres consensuels a enfin été réalisée après l'élimination des 25 000 premiers arbres du total des 100 000 arbres générés (burn-in) avec les deux modèles. Les arbres ont été visualisés au moyen du logiciel Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). L'inclusion dans les alignements N et H d'un groupe externe constitué de séquences appartenant à des virus proches du virus PPR tels que RPV, MV ou CDV, dans le but de placer une racine à nos arbres de séquences a induit une perte de discrimination entre les souches. En conséquence, en nous basant sur des études de datation moléculaire antérieures qui avaient

conclu à une plus grande ancienneté des virus appartenant à la lignée III, la racine des arbres générés a été replacée sur la branche menant à cette lignée [110].

Par la suite, la topologie des arbres a été comparée manuellement afin de déterminer laquelle était la plus vraisemblable, c'est-à-dire se rapprochant au plus près de la réalité historique des souches virales étudiées.

Après comparaison des 6 arbres générés avec nos trois jeux de données, les 3 arbres reconstitués selon le modèle de reconstruction classique étaient plus en accord avec les données épidémiologiques de terrain. L'alignement chimérique N/H a ensuite été retenu pour les analyses phylogéographique ultérieures, le modèle évolutif proposé à l'aide des Logiciels MEGA6 et Treefinder pour cet alignement, a été le modèle TN93 + gamma 5 [157], un modèle à six paramètres.

4.2.3 Origine et distribution de la lignée II dans l'ouest de l'Afrique

Détermination de l'horloge moléculaire et étude de l'évolution du virus PPR par inférence bayésienne et choix du modèle démographique

L'hypothèse de l'horloge moléculaire stricte a été vérifiée par un test ratio de vraisemblance (LRT) comparant la vraisemblance d'un arbre construit dans l'hypothèse d'une horloge moléculaire stricte à celle d'un arbre construit sans horloge moléculaire à l'aide du logiciel MEGA 6 (Tableau 4.5) [158].

Par la suite, les analyses en datation moléculaire ont été réalisées à l'aide du logiciel BEAST. Les 6 fichiers d'entrée du logiciel BEAST ont été générés à l'aide du logiciel BEAUti en utilisant deux modèles d'horloge moléculaire de type relâché ayant pour l'une, une distribution log-normale non corrélée (UCLD) et pour l'autre une distribution exponentielle non-corrélée (UCED). Ces deux horloges ont été testées avec trois modèles de coalescence démographique, soit deux modèles simples dans lesquels l'évolution de taille de la population est constante ou exponentielle et un modèle complexe ne préjugant pas de la forme de l'évolution de la taille de la population (Bayesian Skyline plot).

Chacun des modèles a ensuite été soumis à trois analyses de Chaîne de Monte Carlo Markov (MCMC) indépendantes de 40.000.000 d'itérations avec un échantillonnage toutes les 1000 itérations. Les triplets de 40.000 arbres ont ensuite été combinés en un seul fichier et les 120.000 arbres échantillonnés résultant ont été analysés à l'aide du logiciel Tracer. La fiabilité des résultats en termes de datation du dernier ancêtre commun (TMRCA) ainsi que du taux de Substitution/Site/an a été déterminée par le calcul des probabilités postérieures (ESS).

L'arbre consensuel (MCC Tree) a été calculé par le logiciel Tree Annotator et visualisé dans le logiciel Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) après élimination des 12 mille premiers arbres générés (burn-in). La vraisemblance des différents modèles utilisés avec notre jeu de données a été déterminée par comparaison des valeurs de vraisemblance

Chapitre 4. Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

(marginal log likelihoods) calculée par le logiciel pour chaque modèle (AICM).

Les résultats d'analyse BEAST sont consignés dans le tableau 4.6.

TABLE 4.6 – Résultats d'analyse BEAST. Le meilleur modèle démographique est celui préjugant la croissance exponentielle (en vert), le second est le Bayesian Skyline Plot, modèle sans à priori permettant d'évaluer la diversité génétique de souches virales dans le temps.

Sequence data	Substitution model	Clock model	n°	Demographic model	Mean substitution rate	(95%HPD) Rate	TMRCa (y)	(95%HPD)	AICM
		UCLD	1	Constant Size	7.91E-04	[3.71 E-4_1.25 E-3]	1897	[1844_1961]	518672.896
		UCLD	2	Exponential Growth	7.12E-04	[4.18 E-4_1.06 E-3]	1901	[1850_1949]	29692.369
PPRV NH Concatenés	TN93 + G	UCLD	3	Bayesian Skyline Plot	6.70E-04	[3.98 E-4_9.85 E-4]	1894	[1842_1944]	29794.369
		UECD	4	Constant Size	1.37E-03	[8.34 E-4_4.92 E-3]	1950	[1923_1973]	42897.716
		UECD	5	Exponential Growth	1.23E-03	[6.97 E-4_1.72 E-3]	1941	[1898_1971]	34457.862
		UECD	6	Bayesian Skyline Plot	1.08E-03	[5.25 E-4_1.64 E-3]	1926	[1857_1971]	35639.706

Analyse phylogéographique

Pour cette analyse nous avons choisi de restreindre notre jeu de données aux souches de lignées II de l'ouest africain, cela afin de mieux apprécier les processus de diffusion de la peste des petits ruminants dans la zone. Le fichier d'entrée du logiciel BEAST a été généré à l'aide du logiciel BEAUti en utilisant tous les paramètres du meilleur modèle précédemment identifié, le modèle n°2. Ce fichier contenait aussi des informations de localisations des souches étudiées. Ainsi, 40 souches ont été assignées à 7 zones géographiques distinctes correspondant à : Côte d'Ivoire, Mauritanie, Guinée, Mali et Sénégal (subdivisé en 3 régions le Nord-Est, le Sud-Est et le Nord-Ouest).

Ce modèle a été ensuite soumis à une analyse MCMC indépendante de 10.000.000 d'itérations avec un échantillonnage toutes les 1000 itérations, les 10.000 arbres échantillonnés résultant ont été analysés à l'aide du logiciel Tracer. La fiabilité des résultats a été déterminée par le calcul des probabilités postérieures (ESS).

L'arbre consensuel (MCC Tree) a été calculé par le logiciel Tree Annotator et visualisé dans le logiciel Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) après élimination des 100 premiers arbres générés (burn-in).

4.3 Résultats

4.3.1 Reconstruction phylogénétique bayésienne

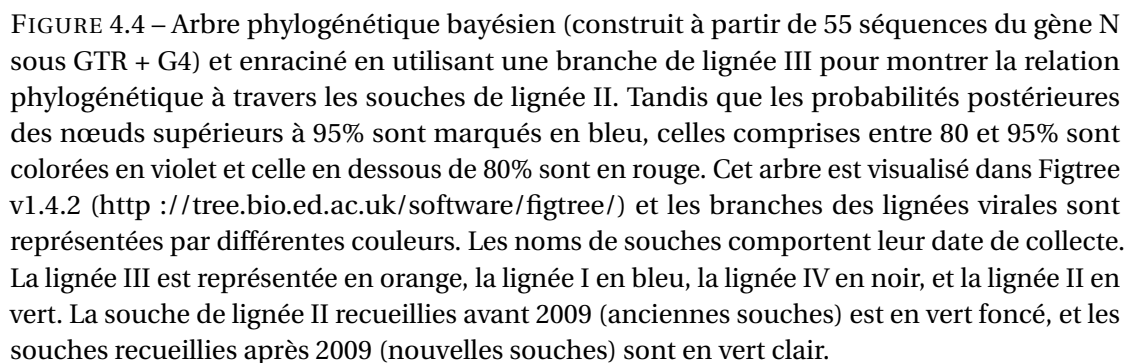
Les phylogénies inférées pour les gènes N, H et N/H nous ont semblé plus cohérentes sous le modèle de reconstruction classique “alignement nucléotidique” (modèle de reconstruction classique).

Les figures 4.4, 4.5 et 4.6 présentent 3 arbres phylogénétiques dont les racines ont été replacées sur la branche menant à la lignée III. Conformément à la répartition phylogénétique des PPRV décrite antérieurement [148, 83], les PPRV se distinguent en 4 lignées (I, II, III et IV). La lignée III (en orange) est représentée par des souches d’Afrique de l’Est, et du Moyen-Orient ; la lignée I (en bleu) est représentée par une souche d’Afrique de l’ouest (ICV89) ; la lignée 4 (en noir) représentée par des souches asiatiques auxquelles s’ajoute celle du Maroc de 2008 ; la lignée II (en vert) est représentée par “l’ancienne souche” d’Afrique de l’ouest (Nigéria 76-1) à laquelle s’ajoutent les souches récemment récoltées au Sénégal, en Mauritanie, en Guinée, en Côte d’Ivoire et au Mali que nous avons dénommées “nouvelles souches”.

Les topologies des 3 arbres reconstruits présentent le même agencement des branches jusqu’au sous-clade de lignée II contenant les “nouvelles souches”. De ce fait nous nous proposons de comparer de façon détaillée chacun de ces arbres à partir du nœud A0, ancêtre commun des “nouvelles souches”.

Analyse comparative des phylogénies des gènes complets N, H et N/H

L’analyse phylogénétique comparée des 3 arbres où le nœud A0 est considéré comme l’ancêtre commun des souches sénégalaises permet de distinguer 9 à 11 clades qui sont rassemblés dans le tableau 4.4.



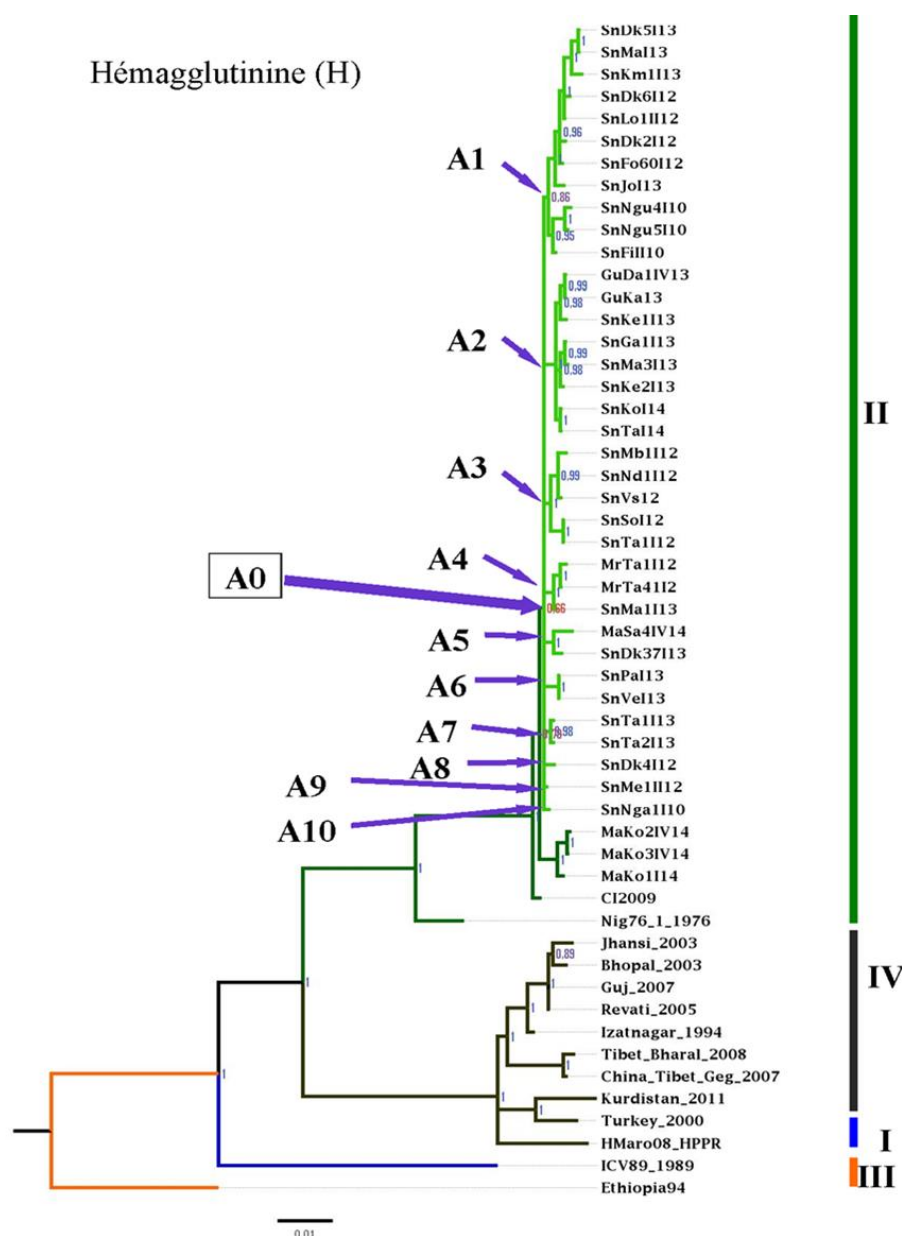


FIGURE 4.5 – Arbre phylogénétique bayésien (construit avec le gène H sous GTR + G4) et enraciné en utilisant une branche de lignée III pour montrer la relation phylogénétique à travers les souches de lignée II. Les probabilités postérieures des nœuds supérieurs à 95% sont marquées en bleu, celles comprises entre 80 et 95% sont colorées en violet et celle en dessous de 80% sont en rouge. Cet arbre est visualisé dans Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) et les branches des lignées virales sont représentées par différentes couleurs. Les noms de souches comportent leur date de collecte. La lignée III est représentée en orange, la lignée I en bleu, la lignée IV en noir, et la lignée II en vert. La souche de lignée II recueillies avant 2009 (anciennes souches) est en vert foncé, et les souches recueillies après 2009 (nouvelles souches) sont en vert clair.

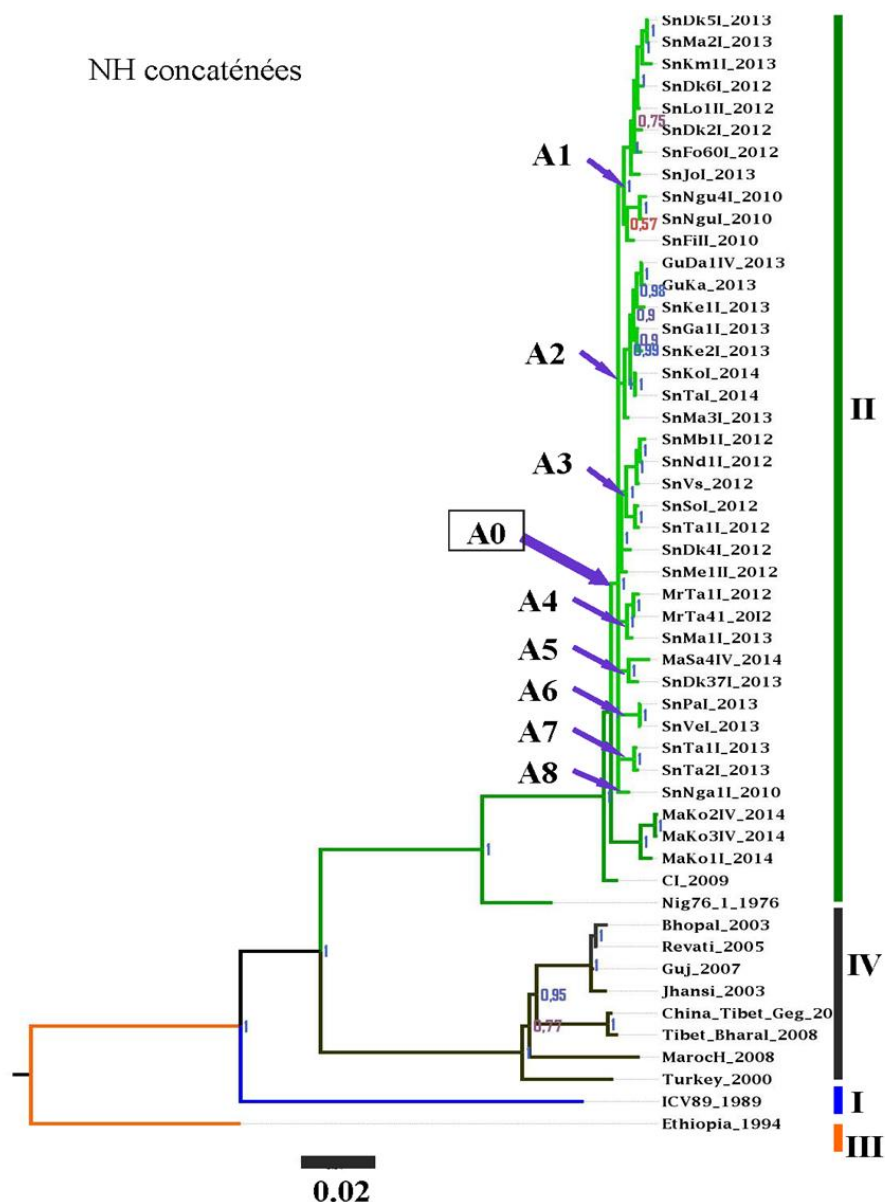


FIGURE 4.6 – Arbre phylogénétique bayésien (construit avec les gènes N/H sous GTR + G4) et enraciné en utilisant une branche de lignée III pour montrer la relation phylogénétique à travers les souches de lignée II. Les probabilités postérieures des nœuds supérieurs à 95% sont marqués en bleu, celles comprises entre 80 et 95% sont colorées en violet et celle en dessous de 80% sont en rouge. Cet arbre est visualisé dans Figtree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) et les branches des lignées virales sont représentées par différentes couleurs. Les noms de souches comportent leur date de collecte. La lignée III est représentée en orange, la lignée I en bleu, la lignée IV en noir, et la lignée II en vert. La souche de lignée II recueillies avant 2009 (anciennes souches) est en vert foncé, et les souches recueillies après 2009 (nouvelles souches) sont en vert clair.

TABLE 4.7 – Tableau de comparaison des clades

	Gène N		Gène H		Gène N/H	
A1	(SnDk2I12)	Senegal Dakar 2 2012	(SnDk2I12)	Senegal Dakar 2 2012	(SnDk2I_2012)	Senegal Dakar 2 2012
	(SnDk5I13)	Senegal Dakar 5 2013	(SnDk5I13)	Senegal Dakar 5 2013	(SnDk5I_2013)	Senegal Dakar 5 2013
	(SnDk6I12)	Senegal Dakar 6 2012	(SnDk6I12)	Senegal Dakar 6 2012	(SnDk6I_2012)	Senegal Dakar 6 2012
	(SnFill2010)	Senegal Fissel 2010	(SnFill10)	Senegal Fissel 2010	(SnFill_2010)	Senegal Fissel 2010
	(SnFo60II12)	Senegal Foundiougne 60 2012	(SnFo60II12)	Senegal Foundiougne 60 2012	(SnFo60I_2012)	Senegal Foundiougne 60 2012
	(SnJol13)	Senegal Joal 2013	(SnJol13)	Senegal Joal 2013	(SnJol_2013)	Senegal Joal 2013
	(SnKm1I13)	Senegal Kompentoum 1 2013	(SnKm1I13)	Senegal Kompentoum 1 2013	(SnKm1_2013)	Senegal Kompentoum 1 2013
	(SnLo1II12)	Senegal Louga 2012	(SnLo1II12)	Senegal Louga 2012	(SnLo1II_2012)	Senegal Louga 2012
	(SnMa2I13)	Senegal Matam 2 2013	(SnMa2I13)	Senegal Matam 2 2013	(SnMa2I_2013)	Senegal Matam 2 2013
	(SnNgu4I10)	Senegal Nguekhoh 4 2010	(SnNgu4I10)	Senegal Nguekhoh 4 2010	(SnNgu4I_2010)	Senegal Nguekhoh 4 2010
	(SnNgul10)	Senegal Nguekhoh 1 2010	(SnNgul10)	Senegal Nguekhoh 1 2010	(SnNgul_2010)	Senegal Nguekhoh 1 2010
A2	(GuDa1IV13)	Guinee Dalaba 1	(GuDa1IV13)	Guinee Dalaba 1	(GuDa1IV_2013)	Guinee Dalaba 1
	(SnGa1I13)	Senegal Gasambery 1 2013	(GuKa13)	Guinee Kaala	(GuKa_2013)	Guinee Kaala
	(SnKe1I13)	Senegal Kedougou 1 2013	(SnGa1I13)	Senegal Gasambery 1 2013	(SnGa1I_2013)	Senegal Gasambery 1 2013
	(SnKe2I13)	Senegal Kedougou2 2013	(SnKe1I13)	Senegal Kedougou 1 2013	(SnKe1I_2013)	Senegal Kedougou 1 2013
	(SnKol14)	Senegal Kolda 2014	(SnKe2I13)	Senegal Kedougou2 2013	(SnKe2I_2013)	Senegal Kedougou2 2013
	(SnTal14)	Senegal Tambacounda 2014	(SnKol14)	Senegal Kolda 2014	(SnKol_2014)	Senegal Kolda 2014
A3	(SnDk4I12)	Senegal Dakar 4 2012	(SnMa3I13)	Senegal Matam 3 2013	(SnMa3I_2013)	Senegal Matam 3 2013
	(SnMb1I12)	Senegal Mban 1 2012	(SnTal14)	Senegal Tambacounda 2014	(SnTal_2014)	Senegal Tambacounda 2014
	(SnMe1III12)	Senegal Mecke 1 2012				
	(SnNd1I12)	Senegal Ndiaffate 2012	(SnMb1I12)	Senegal Mban 1 2012	(SnDk4I_2012)	Senegal Dakar 4 2012
	(SnSol12)	Senegal Soum 2012	(SnNd1I12)	Senegal Ndiaffate 2012	(SnMb1I_2012)	Senegal Mban 1 2012
	(SnTa1I12)	Senegal Tambacounda 1 2012	(SnSol12)	Senegal Soum 2012	(SnMe1III_2012)	Senegal Mecke 1 2012
A4	(SnVs112)	Senegal Velor serrere 2012	(SnTa1I12)	Senegal Tambacounda 1 2012	(SnNd1_2012)	Senegal Ndiaffate 2012
			(SnVs112)	Senegal Velor serrere 2012	(SnSol_2012)	Senegal Soum 2012
					(SnTa1I_2012)	Senegal Tambacounda 1 2012
					(SnVs_2012)	Senegal Velor serrere 2012
A5	(GuKaIV13)	Guinee Kaala				
	(MrTa4I12)	Mauritanie Tarza 4 2012	(MrTa1I12)	Mauritanie Tarza 1 2012	(MrTa1I_2012)	Mauritanie Tarza 1 2012
	(MrTa12)	Mauritanie Tarza 1 2012	(MrTa4I12)	Mauritanie Tarza 4 2012	(MrTa4I_2012)	Mauritanie Tarza 4 2012
	(SnMa1I13)	Senegal Matam 1 2013	(SnMa1I13)	Senegal Matam 1 2013	(SnMa1I_2012)	Senegal Matam 1 2013
A6	(MaSa4I14)	Mali Sagabari 4 2014	(MaSa4IV14)	Mali Sagabari 4 2014	(MaSa4IV_2014)	Mali Sagabari 4 2014
	(SnDk37I13)	Senegal Dakar 37 2013	(SnDk37I13)	Senegal Dakar 37 2013	(SnDk37I_2013)	Senegal Dakar 37 2013
A7	(SnPal13)	Senegal Pakour 2013	(SnPal13)	Senegal Pakour 2013	(SnPal_2013)	Senegal Pakour 2013
	(SnVel12)	Senegal Velingara 2013	(SnVel13)	Senegal Velingara 2013	(SnVel_2013)	Senegal Velingara 2013
A8	(SnTa1I13)	Senegal Tambacounda 1 2013	(SnTa1I13)	Senegal Tambacounda 1 2013	(SnTa1I_2013)	Senegal Tambacounda 1 2013
	(SnTa2I13)	Senegal Tambacounda 2 2013	(SnTa2I13)	Senegal Tambacounda 2 2013	(SnTa2I_2013)	Senegal Tambacounda 2 2013
A9	(SnNga1I_2010)	Senegal Ngairing 1 2010	(SnNga1I_2010)	Senegal Ngairing 1 2010	(SnNga1I_2010)	Senegal Ngairing 1 2010
A10	(SnMa3I_2013)	Senegal Matam 3 2013				
A11			(SnDk4I12)	Senegal Dakar 4 2012		
			(SnMe1III12)	Senegal Mecke 1 2012		

Chapitre 4. Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

La composition en souches des 9 à 11 clades selon qu'il s'agisse de l'arbre N, H ou N/H est similaire, à l'exception de 4 souches qui se replacent différemment dans les clades précédemment définis (Tableau 4.7). En effet dans l'arbre phylogénétique N, la souche de Guinée GuKaIV13 se retrouve dans le clade A4 alors qu'elle s'insère dans le clade A2 des arbres H et N/H, rejoignant ainsi la seconde souche de Guinée GuDaIV13. De même l'arbre N place la souche de Matam SnMa3I dans le clade A7 tandis que celui-ci se retrouve dans le groupe A2 dans les arbres H et N/H, rejoignant ainsi une autre souche de Matam (Gasambery). On note pour finir qu'à la différence des arbres N et N/H qui rangent les souches SnDk4I12 et SnMe112 dans le clade A3, l'arbre H les place au sommet de 2 branches individuelles.

Cette situation témoigne d'un conflit dans le signal phylogénétique entre les gènes N et H qui ne peut être attribué à un événement de recombinaison. L'arbre phylogénétique N/H, basé sur l'alignement de séquences concaténées ajuste globalement l'intégralité des données ; il rassemble les souches selon leur origine géographique à l'exemple des souches guinéennes, mais aussi selon leur date de collecte comme c'est le cas des souches du clade A3 recueillies en 2012 à l'occasion d'épisodes répétés de PPR dans la région Nord-Ouest du Sénégal.

L'alignement N/H constituera de ce fait le jeu de données de choix pour reconstruire les mouvements des 'nouvelles souches' et pour la datation de leur apparition au Sénégal.

4.3.2 Origine et distribution de la lignée II dans l'ouest de l'Afrique

Horloge moléculaire et analyse bayésienne - Estimation du taux d'évolution

Le logiciel BEAST a été utilisé pour calculer les taux de substitution nucléotidiques des gènes N et H concaténés. La comparaison des AICM des modèles d'évolution nous a permis de paramétrer notre jeu de données sous BEAST. Le modèle coalescent de croissance exponentielle associé au modèle de substitution nucléotidique de Tamura et Nei 1993 (TN93+ G4) basé sur une horloge relâchée UCLD a été sélectionné. Sous ces différents paramètres le taux moyen d'évolution de toutes les lignées de PPRV a été estimé à **$7,11 \times 10^{-4}$** substitution/site/an (**95% HPD ($1,06 \times 10^{-3}$ - $4,18 \times 10^{-4}$)**).

Estimation des TMRCA des différentes lignées

La méthode de coalescence bayésienne a permis d'estimer à partir des séquences concaténées des gènes N et H, le TMRCA des différentes lignées, plus particulièrement de la lignée II et des différentes clades qui la composent. L'arbre consensuel (Figure 4.7) a été inféré selon les critères énumérés précédemment. L'âge de l'ancêtre commun le plus récent des 4 lignées virales de PPR qui correspond aussi à celui de la divergence des virus de lignées III a été estimé autour de 1898 (95% HPD 1847-1944). La lignée I a divergé vers 1905 (95% HPD 1863-1945) et l'ancêtre commun le plus récent des lignées II et IV est daté autour de 1928 (95% HPD 1896-1958). Les TMRCA des lignées III et I n'ont pas été estimés compte-tenu du fait que chacune de ces lignées n'est représentée que par un virus. L'ancêtre commun le plus récent

des souches de lignée II est daté autour de 1962 (95% HPD 1951-1973). Le TMRCA des virus de lignée IV utilisés est estimé à 1984 (95% HPD 1973-1993). Enfin notons que le TMRCA de l'ensemble des souches de lignée II nouvellement récoltées dans notre zone d'étude en Afrique de l'ouest est estimé à 2004 (95% HPD 2000-2007).

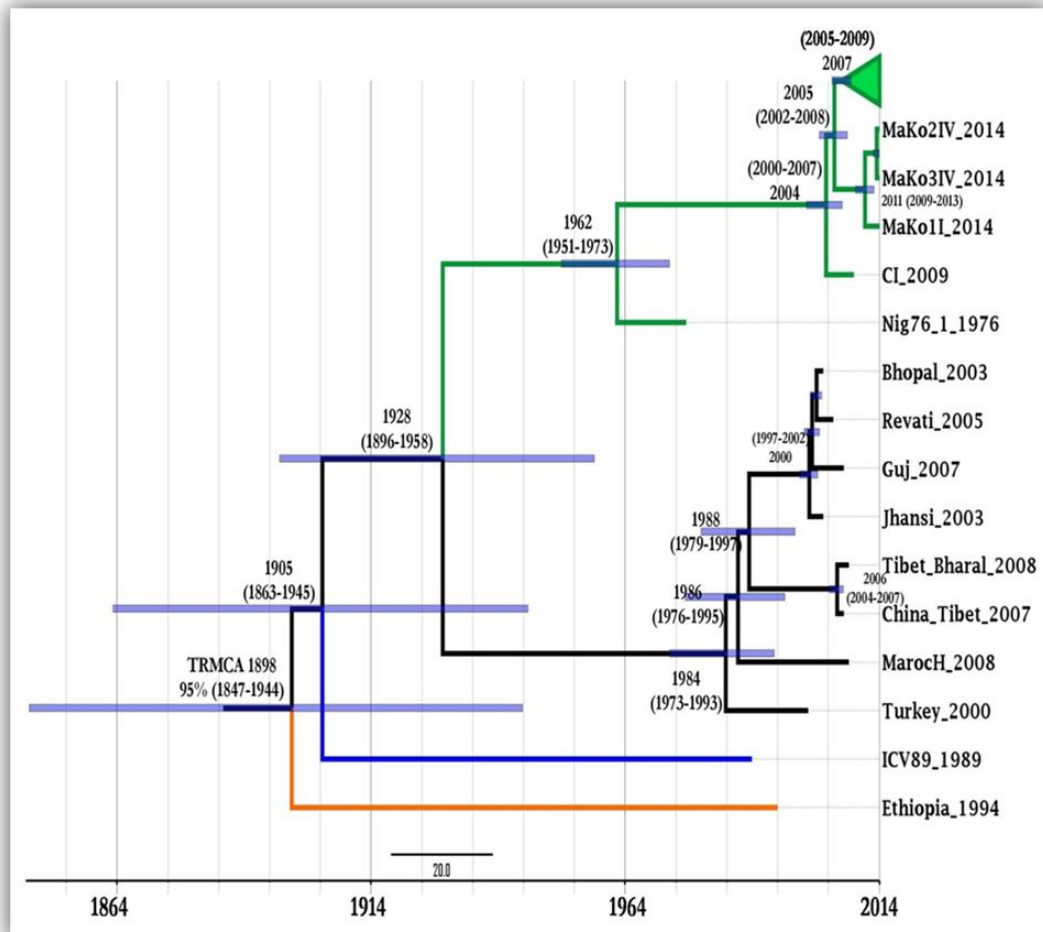


FIGURE 4.7 – Arbre phylogénétique MCC (séquences collapsées) basé sur 51 séquences N/H concaténées de souches virales PPR. L'arbre a été construit en utilisant le modèle UCLD et une croissance exponentielle en a priori. Les noms de souches comportent leur date de collecte et les longueurs des branches reflètent le temps écoulé. Les dates moyennes estimées de TMRCA sont indiquées à chaque nœud. Les valeurs à 95% HPD de l'intervalle correspondant du TMRCA sont représentées par des barres bleues. L'axe horizontal indique la durée en années. Par souci de lisibilité, les souches récentes de lignées II que nous étudions sont collapsées pour former un triangle vert.

Analyse de l'arbre consensuel (Figure 4.8)

L'arbre daté définit 5 clades qui se regroupent au niveau du nœud B0. Il décrit la diversité des souches positionnées sur les nœuds B2, B4 et B5. Les nœuds B1 et B3 sont intermédiaires. Le clade B2 est constitué de souches dont les dates de collecte sont équitablement réparties entre 2010, 2012 et 2013. Le clade B3 est constitué de souches récoltées en 2013 et 2014, et enfin le clade B5 est essentiellement constitué de souches récoltées en 2012. Les clades B4 et B5 sont plus proches entre eux qu'avec B2. Les figures 4.9, 4.10 et 4.11 ci-dessous présentent la distribution spatio-temporelle de ces 3 groupes de souches.

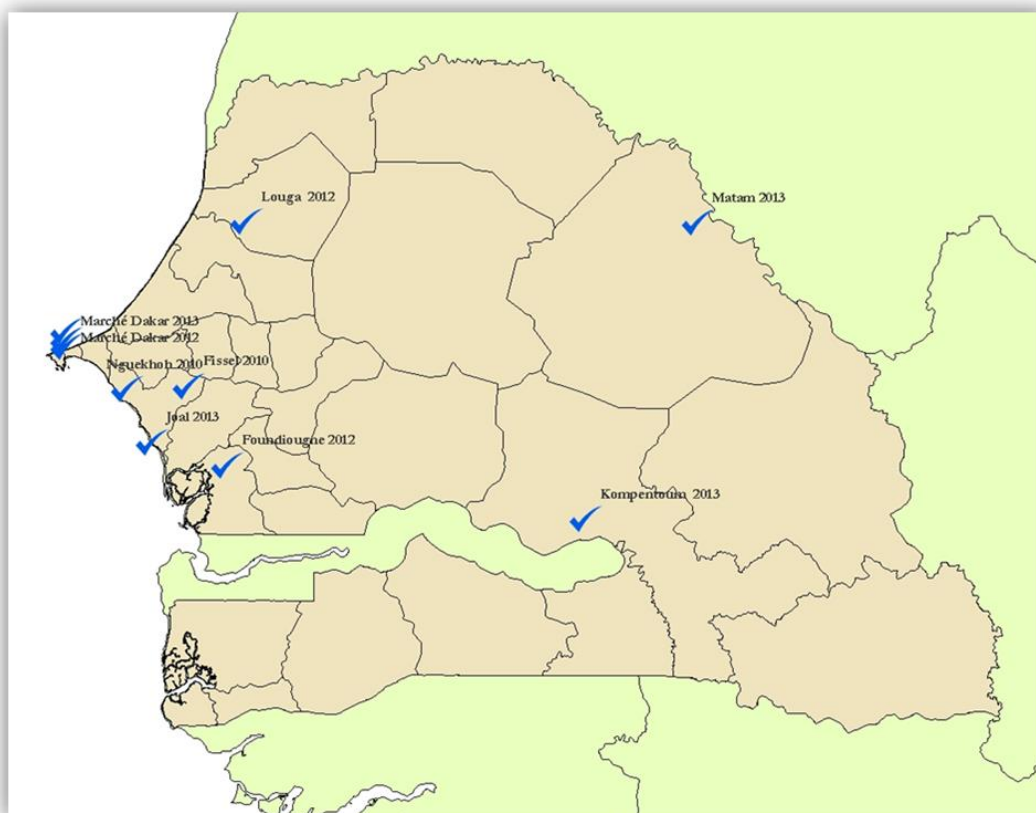


FIGURE 4.9 – Distribution spatio-temporelle (2010-2012-2013) des souches du clade B2. L'épicentre des foyers est situé dans la région nord-ouest du Sénégal, avec 2 souches retrouvées dans les régions de Matam et de Tambacounda (ville de Koumpentoum)

Liens spatio-temporels des souches de PPR prélevées dans le cadre de l'étude

Afin de mieux appréhender le lien spatio-temporel des clades B2, B4 et B5, des souches de ces clades ont été positionnées sur la carte de la région étudiée (Figures 4.9, 4.10 et 4.11). La distribution spatio-temporelle des souches issues des 3 clades suggère que *i)* les souches d'un même clade se maintiennent sur plusieurs années sur leur aire de distribution ; *ii)* pour deux



FIGURE 4.10 – Distribution spatio-temporelle (2010-2012-2013) des souches du clade B4. La distribution se fait dans le sens Ouest-Est et l'épicentre des foyers se trouve dans la région nord-ouest du Sénégal (le bassin arachidier), avec des épisodes dans la région de Tambacounda et une souche identifiée au Mali

de ces clades (B2 et B4), l'aire de répartition est la même. Le constat est qu'il y a certainement des facteurs spécifiques augmentant la diversité des souches dans l'aire en question, lieu d'arrivée de souches exotiques dans la péninsule sénégalaise ; Il s'agit de la région de Dakar où se trouve le plus grand marché de ruminants au Sénégal ; *iii*) quel que soit le positionnement des clades, chacun d'eux est relié à au moins un site stratégique situé dans l'est (Matam) et/ou au centre du Sénégal (Tambacounda). Ces deux villes représentent respectivement le carrefour des voies de transhumances internationales (Mauritanie-Mali) et le carrefour de mobilité commerciale des ruminants.

De 2010 à 2013, il semble avoir eu co-circulation de 2 souches virales dans les régions de Thiès, Dakar, Louga, Kaolack, Tambacounda et Matam (B2 et B4). Les dates de prélèvements recueillies sur le terrain en 2010 confirment l'hypothèse de la circulation d'au moins 2 variants dans une même localité à 3 jours d'intervalle. En effet, les virus isolés de 2 foyers distants de 7 km entre le 25 et le 28 avril 2010 dans la communauté rurale de Nguekhokh se positionnent au niveau de 2 clades différents (B1 et B2). L'observation des mouvements des 3 groupes de

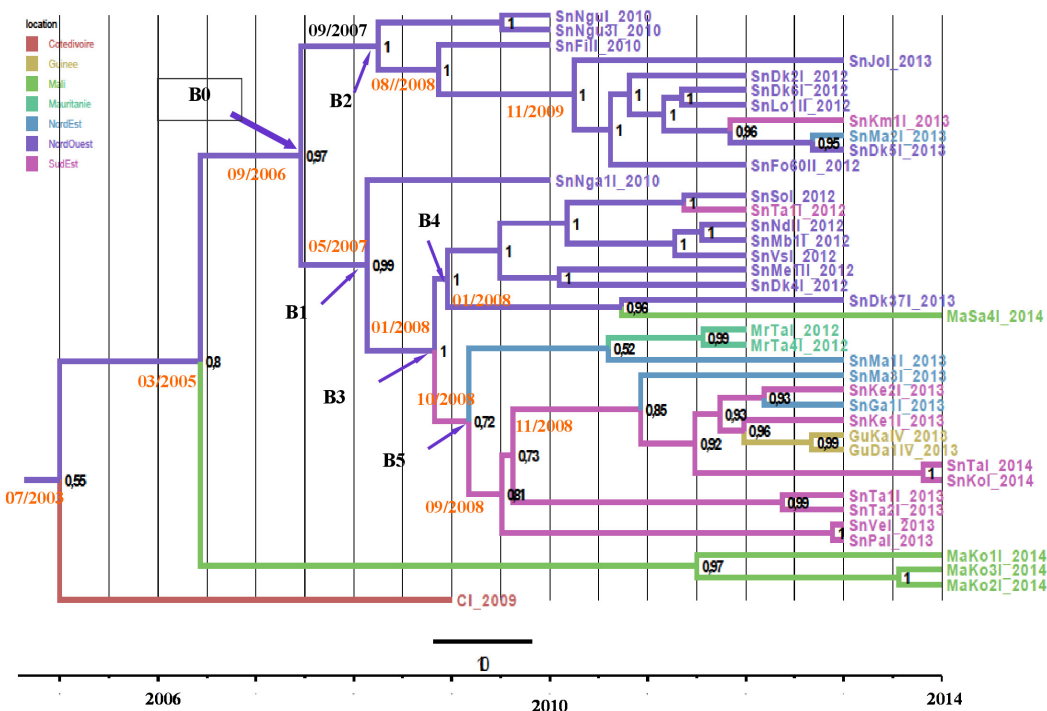


FIGURE 4.11 – Distribution spatio-temporelle (2013-2014) des souches du clade B5. La distribution des souches suit l'axe Nord-Sud. L'épicentre des foyers se trouve dans la région Sud du Sénégal, avec des souches retrouvées en Mauritanie et en Guinée

souches dans le temps met en évidence une circulation primaire des souches virales de l'ouest vers l'est entre 2010 et 2013, puis une secondaire du nord vers le sud entre 2013 et 2014.



FIGURE 4.12 – Distribution spatio-temporelle (de 2010 à 2014) des souches du clade B2, B4 et B5.



donner quelques mois plus tard, l'ancêtre commun des souches résidant aujourd'hui au Sénégal et au Mali. Les deux souches des virus responsables des foyers de Thiès en 2010 se sont séparés en 2008 (nœud B0) et ont co-circulé de façon régulière dans la région nord-ouest du Sénégal de 2010 à 2013. Ces différentes souches se sont parfois retrouvées dans les régions de Matam ou de Tambacounda à l'occasion de la mobilité animale. Le nœud B2 qui regroupe le premier groupe de souches a essentiellement circulé dans le Nord-ouest plus précisément dans le département de Foundiougne et dans le marché de ruminants de Dakar. Il a par la suite migré entre 2012 et 2013 vers le Nord-est (Matam) et le Sud-est (Tambacounda) du Sénégal.

Le second groupe issu de l'ancêtre commun (B4) est à l'origine des épidémies que nous avons observées dans le département de Kaolack en 2012. Comme dans le cas précédent, certaines souches de ce groupe sont d'abord retrouvées dans le département de Tambacounda en 2012 puis au marché de petits ruminants de Dakar en 2013 et enfin dans la localité de Sagabary au Mali en 2014. Les souches de ce groupe partagent un ancêtre commun B3 avec le groupe issu de B5 ; les souches du groupe B5 se sont retrouvées en Mauritanie en 2012, avant d'être impliquées dans des nombreux foyers de PPR dans le sud du Sénégal dans les départements de Tambacounda, de Vélingara, de Kédougou et dans le centre de la Guinée en 2013. En 2014, une souche de ce groupe sera à l'origine de 2 foyers de PPR dans les départements de Kolda et de Tambacounda. L'analyse phylogéographique suggère que l'origine probable de l'ancêtre commun des souches présentes au Sénégal, en Guinée et en Mauritanie est la région Nord-ouest du Sénégal avec une faible probabilité postérieure de 0,56.

La distribution des souches virales correspond (1) aux mouvements internationaux de commerce et de transhumances animales, orientés dans la direction Ouest-Est, (2) à la mobilité nationale, orientée dans la direction Nord-sud, plusieurs mouvements animaux s'opèrent entre département voisins à travers la prolifération des marchés hebdomadaires appelés "louma".

Bayesian Skyline plot

Un « Bayesian skyline plot » (Figure 4.14) a été généré pour l'ensemble des gènes N/H concaténés des souches PPRV de lignée II échantillonnées dans le cadre de l'étude entre 2009 à 2014, afin d'analyser la diversité génétique des séquences au fil du temps. Sur cette période relativement courte, la stabilité de la diversité est le reflet de la situation endémique de la maladie, sans influence apparente d'un contrôle quelconque qui serait dû à l'augmentation de l'impact de la vaccination, par exemple.

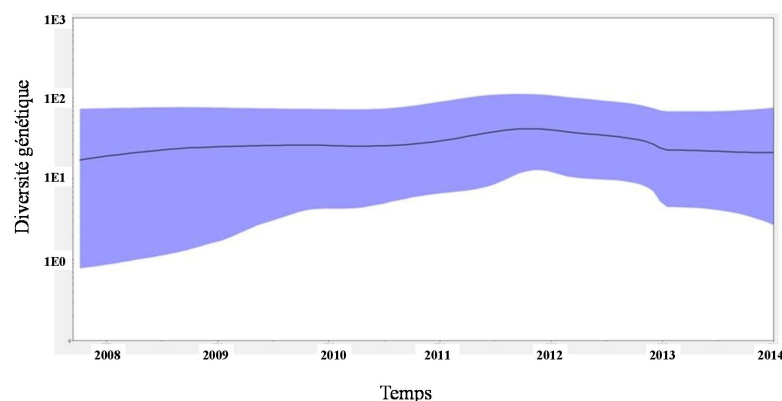


FIGURE 4.14 – Bayesian skyline plot

Figure 4.14 : Dynamique de la population du virus PPR lignée II en Afrique de l'ouest, montrant le niveau de changement de la diversité génétique ainsi que sa constance dans le temps (de 2008 à 2014). Cette figure montre le Bayesian Skyline plot des gènes N/H concaténés des PPRV lignée II échantillonnés dans la sous-région de 2009 à 2014. L'axe Y représente la diversité génétique ($N_e \times t$) où N_e est la taille effective de la population, et le temps de génération dans l'hypothèse stricte de neutralité (considérant que cette méthode ne constitue pas un moyen indépendant pour évaluer la puissance respective de sélection et dérive).

4.4 Discussion

Nous rapportons ici la première étude à grande échelle de la diversité génétique de PPRV sur un large territoire centré sur le Sénégal. En effet grâce à un échantillonnage d'hôtes en phase clinique sur une grande partie du Sénégal et ses pays frontaliers, Mauritanie, Mali, Guinée et Côte d'Ivoire, les séquences virales obtenues et celles déjà disponibles ont permis d'estimer la vitesse d'évolution sur 4 années du PPRV dans cette région particulière d'Afrique. Le Sénégal, d'où la majorité des souches proviennent, est un pays caractérisé par un élevage pastoral ou sylvo-pastoral extensif et transhumant et où le brassage des populations de petits ruminants est très important ce qui est un facteur de maintien de la maladie. Avec le focus particulier qu'elle fait sur l'ouest africain, notre étude consolide l'histoire épidémique des lignées virales et complémente celles basées sur le génome complet de souches de PPRV isolées sur l'ensemble des territoires enzootiques de la maladie [110, 122]. Nous observons

que la lignée II est majoritaire dans toute la zone géographique étudiée, une seule souche de lignée I ayant été obtenue dans une localité du Mali, indiquant que cette lignée qui prévalait historiquement dans tout l'ouest africain est quasi éradiquée. L'originalité de notre étude réside dans le fait qu'elle est contemporaine à l'établissement de la lignée II dans son bassin d'extension ouest africain car nous estimons à 2005 la date d'installation des premières souches de cette lignée dans la zone d'étude.

Même si jusqu'ici, le manque crucial de données moléculaires disponibles pour la région était une lacune sérieuse à la compréhension de la PPR, l'analyse que nous avons faite des données maintenant disponibles présente cependant des limites liées à l'échantillonnage circonstanciel effectué sur foyers. En effet la PPR fait l'objet d'une surveillance événementielle qui se limite à attendre les déclarations des éleveurs. De plus son caractère endémique provoque une certaine lassitude de tous les acteurs du réseau épidémiologique [138], entraînant une sous-déclaration. Tributaires également des échantillons disponibles des pays frontaliers du Sénégal, notre échantillonnage a été de ce fait déséquilibré.

Notre étude s'est basée sur l'analyse de l'évolution des gènes N et H car ces gènes traduisent deux protéines bien exprimées chez les **Morbillivirus**, l'une étant structuralement interne et l'autre externe. La protéine N est la protéine majeure du virus avec des fonctions primordiales dans la réplication et la transcription en association avec la L et la P. Le « fitness » (chances de survie) à long-terme du virus est fortement associée au niveau d'expression du gène de N ; plusieurs auteurs estiment que l'expression de ce gène a un effet primordial sur l'évolution la protéine et donc du virus [166, 115, 123]. La protéine H est la clé d'entrée du virus dans la cellule hôte et un déterminant antigénique majeur des **Mononegavirales**. En raison de son interaction avec le système immunitaire de l'hôte et à la présence de plusieurs régions hypervariables, la protéine H est supposée être soit sous sélection négative faible, soit sous sélection positive plus forte que les autres protéines virales [123].

Chez le virus de la rougeole (MV), il a récemment été démontré qu'il existe une corrélation étroite entre le taux évolutif du génome complet et ceux des gènes L, N et H. En outre les séquences des gènes N et H sont les plus couramment utilisées pour la caractérisation génétique des virus du **genre Morbillivirus**, bien que trop souvent sur une séquence partielle ; le gène L, pour ce qui le concerne étant désavantagé par sa trop grande taille pour le séquençage [165].

Des méthodes phylogénétiques récentes ont été utilisées sur un jeu de données composé de 51 séquences N et H concaténées de PPRV. Le choix de concaténer ces séquences a été motivé par la recherche d'un signal phylogénétique plus fort. Plusieurs auteurs recommandent de concaténer les séquences moléculaires dans l'objectif d'avoir la plus fine phylogénie possible. La concaténation a en effet prouvé sa capacité à induire un signal phylogénétique suffisant pour résoudre des divergences profondes [69, 59, 39].

L'une des composantes qui permettent l'étude de l'évolution moléculaire est l'évaluation du taux de mutations qui se définit comme une mesure de la vitesse à laquelle les différentes mutations se produisent, certaines d'entre elles étant létales, d'autres au contraire conduisant

à une meilleure adaptation de la progénie. Notre étude conforte celles de Muniraju (2014) et de Padhi (2014) [110, 122], pour estimer le taux de substitution nucléotidique et restituer sur l'échelle de temps l'ancêtre commun le plus récent des lignées PPRV circulant actuellement de part le monde ainsi que pour l'estimation de la date d'apparition de chacune des lignées. Nos analyses estiment le taux de substitution nucléotidique compris entre $1,06 \times 10^{-3}$ à $4,18 \times 10^{-4}$ (subs/site/an), ce qui corrobore les taux estimés lors d'études semblables : 1.64×10^{-3} à 2.13×10^{-4} (subs/site/an) sur les PPRV et 10^{-3} to 10^{-4} (subs/site/an) pour MV et les autres paramyxovirus [110, 128, 58].

Le taux de substitution que nous avons observé dans le bassin de diffusion enzootique étudié peut servir de référence pour de futures études. En effet, il a été démontré que les lignées virales des régions épidémiques ont tendance à avoir des taux de substitution plus élevés que ceux des régions endémiques, et les lignées circulants sur des populations ayant des taux élevés de contacts ont tendance à avoir des taux de substitution plus élevés que ceux des populations ayant moins de contacts [143]. De plus, dans le cas de MV, il semble qu'en cas de circulation épidémique de la maladie sur une population vaccinée, le taux de substitution du gène H peut être modifié à brève échéance et être ainsi un outil décisif pour des programmes de surveillance épidémiologique et de contrôle [111].

Par ailleurs, cette vitesse d'évolution permet d'expliquer l'histoire très contemporaine de la diversité génétique de PPRV actuellement sous 4 lignées, diversité acquise à partir de la fin du 19ème siècle. A partir de l'arbre phylogénétique MCC (figure 4.7) nous montrons que la lignée III s'est séparée de l'ancêtre PPRV le plus proche vers 1900. La lignée I s'est ensuite séparée du groupe restant (I, II, IV) en 1905 et les lignées II et IV se sont séparées en 1928. Les TMRCA estimés dans cette étude et ceux des études similaires menées récemment par Muniraju et al. 2014 et Padhi et al. 2014 [110, 122] sont présentés dans le tableau 4.8.

Les dates estimées du TMRCA et de divergence de la lignée III sont similaires d'une étude à l'autre. Elles s'accordent sur le début du XXème siècle quel que soit le jeu de données utilisé, avec des intervalles de confiance assez similaires entre eux qui se démarquent de ceux obtenus avec les génomes entiers couvrant plus de 200 ans [110]. Ce large intervalle s'explique par la taille réduite de l'échantillonnage de cette étude qui n'a concerné que 12 génomes entiers. Nous estimons à 1905 la date de l'évènement de spéciation de la lignée I en deux autres lignées II et IV alors que Muniraju et al. 2014 [110] l'estime à 1939 ; néanmoins les intervalles de confiance entourant ces valeurs sont quasiment semblables. De même, nous estimons à 1928, l'évènement de spéciation où les deux dernières lignée II et IV divergent tandis que Muniraju et al. 2014 [110] la situe à 1956 avec des intervalles de confiance assez semblables.

Notre étude montre que la diversité génétique couramment observée prend son essor à une date que nous estimons pour la lignée II être vers 1962 et celle de la lignée III est estimée par Muniraju et al. 2014 à 1956 [110]. Pour notre part n'ayant pas assez d'informations moléculaires sur la lignée III, nous n'avons pu estimer sa date de divergence. Par ailleurs, tous les auteurs s'accordent pour dire que lignée IV acquière sa diversité génétique actuelle à partir de 1985

Chapitre 4. Reconstruction des mouvements géographiques des PPRV

TABLE 4.8 – Tableau de comparaison des dates des ancêtres communs (TMRCA)

Date de spéciation des lignées						
			Lignée III (TMRCA PPRV)	Lignée I	Lignées II et IV	
Nos	résul-	Gène	1898 (95% HPD	1905 (95% HPD	1928 (95% HPD 1896-1958)	
tats		concaté- nés	1847-1944)	1863-1945)		
Padhi et al., 2014 [122]		Gène N	1895 (95% HPD 1808-1946)	0	0	
		Gène F	1910 (95% HPD 1873-1939)	0	0	
Muniraju et al. 2014 [110]		Génome entier	1904 (95% HPD 1730-1966)	1939 (95% HPD 1843-1970)	1956 (95% HPD 1886-1973)	
		Gène N	1895 (95% HPD 1808-1946)	0	0	
Acquisition de la diversité génétique						
			Lignée IV	Lignée II	Lignée III	Lignée I
Nos	résul-	Gène	1984 (95% HPD	1962 (95% HPD	0	0
tats		concaté- nés	1973-1993)	1951-1973)		
Padhi et al., 2014 [122]		Gène N	1988 (95% HPD 1981-1992)	0	0	0
		Gène F	1987 (95% HPD 1976-1992)	0	0	0
Muniraju et al. 2014 [110]		Génome entier	1967 (95% HPD 1957-1995)	0	1956 (95% HPD 1887-1978)	0

mais avec des intervalles de confiance assez faibles. On peut rappeler que le premier PPRV caractérisé comme tel, car confondu jusqu'alors avec le RPV en Inde l'a été en 1989 [147].

Les résultats de l'horloge moléculaire et de l'arbre phylogéographique rapportés ici indiquent clairement que la lignée II maintenant enzootique en Afrique de l'ouest prend son origine au Nigéria comme le montre son lien à l'une des anciennes souches de lignée II récoltées dans les années 70 [161] dans ce pays, représenté ici par la souche Nig 76/1 (Figure 4.7). La figure 4.7 peut également être utilisée pour estimer le temps mis par la lignée à s'exporter du Nigéria à l'ouest africain. Nous estimons que l'entrée dans l'extrême ouest de l'Afrique de la lignée II, maintenant à l'origine de la majorité des épidémies, s'est faite à partir d'une zone centrée sur le Nigéria et se situe dans une fourchette comprise entre 2000 et 2008, l'ancêtre commun des souches récentes étant daté à 2004. Il aura fallu environ 28 ans pour que la lignée II chemine jusqu'aux frontières du Sénégal. Cependant les âges de ces événements d'entrée et de sortie peuvent être surestimés par manque d'échantillonnage.

Il se trouve qu'ayant utilisé la souche Côte d'Ivoire 2009, dans le scénario évolutif, elle se place en position intermédiaire entre la souche historique du Nigéria et les souches nouvellement étudiées. Mais ce lien n'est pas statistiquement solide et est fragilisé également par le poids du sur-échantillonnage au Sénégal. Certains auteurs s'accordent à dire qu'il est souvent très difficile d'estimer l'origine géographique des virus lorsque les régions suffisamment proches du territoire étudié sont sous-représentées [110]. Un point plus détaillé de la situation régionale aurait pu être réalisé avec un nombre plus important d'échantillons équitablement répartis dans le temps et dans l'espace. Les moyens financiers adéquats, une plus grande implication des différents acteurs de la filière petits ruminants, voire des raisons d'insécurité peuvent être invoqués. A titre d'exemple notre étude n'a pas concerné la basse Casamance au sud-ouest du Sénégal pour cette dernière raison.

Les mouvements trans-africains à l'origine du déplacement est-ouest de la lignée II trouvent leur origine dans le commerce de bétail à la croisée des frontières, une évidence économique et culturelle en Afrique de l'Ouest. Une étude récente sur le risque potentiel de diffusion des maladies à l'échelle régionale par le commerce de bétail transfrontalier entre le Togo, le Burkina Faso, le Ghana, le Bénin et le Nigeria [38] confirme cet état de fait. Les animaux de tous ces pays qui se retrouvent sur les marchés du Nord Togo pendant la saison sèche sont en nombre presque égal au quart de la population de bovins résidents. Il est possible que certains animaux proviennent même de plus loin, comme le Mali ou le Niger. Par ces marchés à bestiaux, des pays non limitrophes sont potentiellement reliés épidémiologiquement par des routes commerciales.

Nous avons mis en évidence le rôle de dissémination virale joué par les plus grandes zones d'élevages du Sénégal que sont la région de Dakar, du Bassin arachidier, de Tambacounda et de Matam. On note d'une part une circulation de souches de la même lignée II de PPRV au Sénégal, au Mali, en Guinée et en Mauritanie ; et d'autre part une co-circulation des lignées I et II au Mali. Un tel phénomène de co-circulation entre 2 lignées a été récemment observé au Nigéria, mettant en évidence l'introduction et la large distribution des souches de lignée IV proches de celles identifiées en 1997 au Cameroun [80], dans un pays où la lignée II était historiquement établie [168].

L'analyse phylogéographique et la distribution spatio-temporelle au Sénégal nous ont permis de reconstituer l'histoire évolutive récente des souches de PPRV nouvellement décrites. Nous avons constaté sur la période de 2010 à 2012 que l'activité virale dans la région de Dakar, appelée région nord-ouest, suit une migration vers le sud-est du pays, sur la période de 2013 à 2014, un mouvement nord-sud avec l'épicentre des foyers localisé dans le sud. De tels mouvements pourraient se justifier par la structure en entonnoir des flux de l'élevage au Sénégal [30] où les mouvements est-ouest et sud-ouest via la route nationale 1 et le chemin de fer vers la région de Dakar tendent à constituer un lien épidémiologique fort entre la région particulière de Dakar avec le reste du Mali et donc explique l'afflux de lignée II à l'extrémité de la péninsule de Dakar. Cependant au niveau local il semble exister un reflux ouest-sud et un mouvement nord-sud dû à l'activité de transhumance (incluant aussi la Mauritanie)

et des marchés de Dahra, Tambacounda et de Matam. Ces mouvements animaux s'opèrent également entre département voisins à travers la prolifération des marchés hebdomadaires appelés "louma". Une situation similaire où l'on retrouve une superposition des mouvements viraux/animaux avait déjà été décrite dans certains pays endémique de PPR [15].

Des campagnes de vaccination annuelles et régulières sont organisées par l'Etat et exécutées par la direction des Services Vétérinaires (DSV). Cependant leur efficacité est très limitée, seulement 2 millions de doses sont utilisées pour un effectif estimé à 10 millions de tête. La vaccination n'a apparemment pas d'effet sur la variation dans le temps de la diversité génétique virale. Il est observé qu'elle est constante sur la courte période de 2009 à 2014, et cette stabilité est le reflet de la situation endémique de la maladie, sans influence apparente d'un contrôle quelconque qui serait dû à l'augmentation de l'impact de la vaccination, par exemple. Cela pourrait se justifier par la mise en place récente des campagnes nationales de vaccination PPR au Sénégal (2002) et par le faible taux de couverture vaccinale réalisé annuellement [48].

Par ailleurs, au Sénégal, l'absence d'identification et de traçabilité animale rend difficile l'évaluation de la couverture vaccinale et son amélioration. Le taux de couverture vaccinale annoncé en fin des campagnes annuelles est inférieur à 20% depuis près de 14 ans [48]. Notons que ces calculs de taux annuels ne tiennent pas compte les effectifs préalablement vaccinés alors même que la vaccination produit une immunité sur la vie économique de l'animal. On pourrait suggérer que pour un effectif des petits ruminants constant (10 millions de têtes) et avec un taux de renouvellement annuel de 30%, une stratégie de vaccination avec marquage du cheptel à une année A0 (soit 10 000 000 de doses) suivie de campagnes annuelles pour vacciner les 30% d'animaux renouvelés (soit 300 000 doses) pourrait permettre un maintien du taux de couverture vaccinale au-delà de 90% et empêcher toute circulation de PPRV. Toutefois une telle stratégie nécessite une volonté politique ferme appuyée par des moyens financiers appropriés.

5 Génomes complets et possibilités d'exploitation

L'étude précédente a permis à partir des gènes entiers concaténés de la nucléoprotéine et de l'hémagglutinine d'estimer la vitesse d'évolution des PPRV sur 4 années dans l'ouest africain. Ces gènes se sont révélés être de bons marqueurs phylogénétiques car porteurs d'information génétique permettant d'établir les circuits de diffusion des virus et leurs hôtes. Les études sur l'évolution moléculaire partagent toutes un objectif commun, celui d'élucider les relations historiques entre différentes espèces en utilisant des marqueurs moléculaires polymorphes. Celles-ci sont cependant limitées par l'insuffisance de résolution phylogénétique due entre autres à la taille des marqueurs moléculaires utilisés.

Les progrès récents observés dans le séquençage massif de l'ADN, ont été qualifiés de technologies révolutionnaires par la communauté scientifique. Il est désormais possible d'obtenir rapidement de très grandes quantités de données de séquences, et de mettre en commun grâce au multiplexage, plusieurs échantillons à séquencer [152].

Les virus à ARN de par leur petit génome peuvent être avantagés pour l'utilisation des technologies NGS, cependant la très faible proportion de l'ARN viral par rapport à celui de l'hôte entrave fortement les projets de séquençage de ces génomes viraux. Concernant le PPRV, seules 15 séquences de génomes complets de souches représentatives ont été séquencées jusqu'ici en utilisant la méthode de Sanger et publiée par différents auteurs.

Dans ce chapitre nous présenterons les premiers travaux de séquençage Illumina sans à priori et à très haut débit des PPRV provenant d'échantillons cliniques ou d'isolats viraux. Nous décrivons ici une méthode simple et efficace de préparation d'ARN viral, sans utilisation d'ultracentrifugation, ni de filtration ou de protocole d'enrichissement viral.

Trente virus de PPR ont été recueillis de 2010 à 2014 au Sénégal, au Mali, en Guinée, en Mauritanie, en Algérie et aux Comores. Le séquençage à haut débit sans à priori de ces souches a permis d'obtenir 16 génomes complet sur les 30 échantillons, après alignement des lectures sur la séquence d'un génome de référence.

Chapitre 5. Génomes complets et possibilités d'exploitation

La stratégie de séquençage présentée dans ce travail permet de séquencer simultanément les génomes complets de toutes les lignées de PPRV et à moindre coût. En incluant nos séquences obtenues dans les bases de données publiques, nous augmenterons considérablement la quantité de données génomiques disponibles pour des PPRV circulant dans le monde et surtout au Sénégal. Cela contribuera significativement à l'étude de l'évolution phylogénétique des souches de PPRV en utilisant des méthodes d'inférence robustes pour soutenir la prise de décision dans une approche optimisée de contrôle de la PPR.

Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse. Il a fait l'objet de deux publications, la première en cours de soumission (Partie 5.1) et la seconde publiée dans Genome Announcements en septembre 2014 (Partie 5.2).

5.1 Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV

Salami H, Croville G, Kwiatak O, Mariette J, Klopp C, Valière S, Guérin JL, Lo M, Thiongane Y, Albina E, Libeau G.

Abstract

Background : Peste des petits ruminants is a highly infectious transboundary disease of small ruminants. Despite this, only 15 complete genome sequences of representative strains have been sequenced and published using the Sanger method. Due to the relatively low abundance of viral RNA in relation to host RNA, RNA viruses have proved relatively difficult to sequence using next generation sequencing (NGS) technologies.

Methodology/Principal findings : Thirty viruses were collected from 2010-2014 in Senegal, Mali, Guinea, Mauritania, Algeria and Comoros and analysed. For 16 out of the 30 samples, PPRV full genome sequence was successfully obtained using a semi-automated sequencing method and assembly of reads with a software package for mapping against a reference genome.

Conclusion significance : The sequencing strategy presented in this work allows for PPRV genomes to be sequenced simultaneously and with low cost. By including the sequences obtained in this study in the public databases, we have significantly increased the amount of genomic data that is available for PPRV circulating over the world especially in Senegal. This should greatly help for the comprehensive phylogenetic evolution of PPRV strains using robust inference methods to support decision making in an optimized approach of PPR control.

Introduction

Peste des petits ruminants is a highly infectious transboundary disease of small ruminants that affects mainly sheep and goats and small wild ruminants. This notifiable disease to the World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties, OIE) [Albina et al., 2013] imposes considerable economic losses in much of the world with effects on food security and animal products. Thus PPR has been proposed as the next animal disease to be eradicated after rinderpest (FAO, 2013).

The cause of PPR peste des petits ruminants virus (PPRV) belongs to the *Morbillivirus* genus, *Paramyxoviridae* family, and has a negative-sense single-stranded RNA genome of about 15.9 kilobases. The genome encodes eight proteins, nucleocapsid (N), phosphoprotein (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin (H), a large RNA-directed RNA polymerase (L), and two additional non-structural proteins, V and C, generated by RNA editing during P gene transcription [Minet et al., 2009].

All phylogenetic analyses undertaken to date reveal four distinct lineages whether based on the partial F or N protein genes of PPRV (Shaila et al., 1996 ; Dhar et al., 2002 ; Kwiątek et al., 2007). Thus most epidemiological and evolutionary studies reported worldwide for PPRV have been based on the analysis of both of these genes. Those studies have provided a significant number of small fractions (less than 300bp) from different PPRV strains and only 15 complete genome sequences of original PPRV strains have been published (Muniraju et al, 2014 ; Dundon et al., 2014 ; Muniraju et al, 2013 ; Bao et al., 2011 ; Chard et al., 2008 ; Bailey et al., 2005), 12 of them were analysed to gain a better understanding of the evolutionary and epidemiological dynamics of PPR virus throughout endemic regions (Muniraju et al., 2014).

Lack of high resolution of sampling of host populations and lack of efficient sequencing methods available for PPRV has contributed to the limited knowledge of PPRV evolution and at genome level.

This work was performed in an effort to develop cost-effective approach to sequence the whole genome of the PPRV describing a robust, simple, reliable methodology to obtain full genome sequences from original clinical material and cultured samples. Thus our work significantly increases the amount of complete genomic data publicly available.

Materials and Method

Biological samples Samples consisted of ocular swabs and lungs collected from sick sheep and goats with suspected PPR and also isolated viruses on CHS cell culture (Adombi et al., 2011). Lung samples (0.5 g) were ground in 2 ml of MEM medium, and then clarified by centrifugation (5000 g, 3 min, 4 °C). Flasks with isolated viruses were harvested after three cycles of freezing (-70 °C) and thawing (37 °C). Cells and supernatants were then centrifuged for 10 minutes at 1500 rpm at 4 °C. Aliquots of 500 µl of supernatant of two viral suspensions were stored at the (-80 °C).

Sample purification by immunocapture This protocol was inspired from the Immucapture Elisa technique developed by Libeau (1994). Immunocapture step allows getting rid of the chemical step of viral RNA extraction while reducing cellular contaminants from the biological sample. Anti N-PPRV antibody coated PCR tubes (prototypes developed by IDVet) were incubated with 150 µl of aliquoted viral suspensions. Antibody captured viral nucleoprotein went through a series of 6 washes with 170 µl of MEM medium to eliminate cell debris and non-captured virus particles. Captured nucleoprotein containing the viral RNA was released from tube walls by adding RAV1 solution (RNA / DNA isolation Macherey Nagel kit), then heated at 70 °C for 10 minutes. Viral RNA was extracted in 50 µl of water according to the manufacturer's instructions.

5.1. Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV

PPR RNA template quantification versus the b-Actine housekeeping gene by One-step Real Time PCR-Taqman Protocol Quantification of RNA templates extracted from samples or viral solutions was carried out using the AgPath.ID one-step RT-PCR kit (Applied Biosystem) according to the quantitative RT-PCR protocol (qRT-PCR) developed for PPR diagnosis (Kwiatek O 2010). PPR viral load was expressed in copies/reaction using a standard curve obtained using tenfold serial dilutions of a PPR transcript. The contamination of the extracted RNAs by the b-Actine housekeeping gene was measured in Ct values according to a modification of the previously published protocol (Toussaint et al, 2006) using AgPath.ID one-step RT-PCR kit (Applied Biosystem).

RT-PCR and amplification products purification Viral RNA was retro-transcribed using primers with randomized 3' ends and tags on the 5' UTR (Victoria et al., 2009) at 5' extremities of cDNA. For reverse transcription, 7.5 μ l of viral RNA was mixed with 0.1 nmol of tagged random hexamer primers and incubated for 5 min at 65°C. Then, 4 μ l of 5X reaction buffer (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA) was added to this mixture at the same time as 0.5 μ l of RNase Out (Life Technologies, Carlsbad, CA), 20 nmol of deoxynucleoside triphosphate (dNTP) solution (Finnzymes, Espoo, Finland) and 1 μ l of RevertAid reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific). The reaction volume was completed to 20 μ l with distilled water. The RT reaction was performed at 42°C for 60 min and terminated by heating at 70°C for 10 min.

The second strand cDNA was synthesized by mixing 10 μ l of cDNA with 50 pmol of the same tagged random hexamer primers as previously used, 3 μ l of 10X React 2 Buffer (Life Technologies), 0.5 nmol of dNTP solution, 0.5 U of Large Fragment of DNA Polymerase I (Life Technologies) and water to make a total volume of 30 μ l. The incubation step was performed at room temperature for 60 min.

The PCR mix was prepared and contained 33 μ l of distilled water, 10 μ l of 5X buffer (ThermoFisher Scientific), 10 nmol of dNTP solution (Finnzymes), 10 pmol of primer (corresponding only to the tag previously used), 5 μ l of the double stranded cDNA and 2 units of Phusion High-Fidelity DNA polymerase (ThermoFisher Scientific). The amplification program consisted of a first 30 s step at 98°C followed by 40 cycles with the following conditions : 98°C for 10 s, 65°C for 20 s, and 72°C for 30 s. The program ended with 1 step at 72°C for 10 min.

The amplification products were separated by electrophoresis using 1% agarose gel. Observed bands around 300 bp were excised from the gel and purified using the QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. These PCR products were eluted into 50 μ l of distilled water and subsequently used for the MiSeq sequencing. The Qubit® and NanoDrop® instruments may be used together to determine RNA or DNA concentration—the Qubit® Fluorometer for accurate quantification of the target molecule and the NanoDrop® spectrophotometer to indicate contaminants. We measured DNA concentration from the PCR products based on these two instruments.

MiSeq sequencing and bioinformatic analysis DNA libraries were constructed using the BiooScientific PCR-free DNA sequencing kit (Bioo Scientific, Austin, TX) with slight modifications : no sonication was done on RT-PCR fragments. Libraries were then quantified by quantitative PCR using the KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) to obtain an accurate quantification. Sequencing has been performed on a MiSeq (Illumina, San Diego, CA) sequencer using a paired-end read length of 2x300 pb with the Illumina MiSeq reagent Kits v3 (Illumina).

We initially generated 40 million reads of about 150 nucleotides in length for this study. Considering different criteria such as quality, 39.23% of the generated reads were filtered and deleted using Illumina CASAVA-1.8 FASTQ Filter (<http://www.illumina.com/>). A total of 24 million reads were finally obtained.

Reads were then demultiplexed and sorted by tag and the sequences corresponding to each PPR sample were pooled in a unique fastq file. The trimming of the tag sequence was performed and the overlapping reads were assembled into contigs.

The remaining reads were aligned against the reference genome (accession number KM212177) using bwa (Li and Durbin, 2009) then sorted and indexed with the SAMtools (Li et al., 2009) software package. The resulting files were finally displayed within the IGV browser (Robinson et al., 2011). The consensus sequences were computed with the SAMtools software package.

Missing regions The coverage quality of the consensus sequences depends upon the quality of continuous sequences generated by aligning overlapping sequencing reads. Data set was affected by the size and continuity of contigs, causing the presence of gaps in consensus sequences. After bioinformatics analysis, the remaining nucleotides gaps (between 5 to 14% of those genomes) were filled using conventional reverse transcription and sequenced using specific primers (Table 5.1, Cogenics, United Kingdom). The nucleotide sequences of the 3' leader region and the 5' trailer region were determined by rapid amplification of cDNA ends (RACE, Roche) using specific primers binding in the leader and trailer sequences and poly(A) tailing using terminal transferase (TdT) and dATP. Then, the completed genome was realigned against the reference genome (KM212177).

5.1. Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV

TABLE 5.1 – List of specific primers

Amorce	Position	Sequence
Amorce T1	864>883	ATGATCTGCGACATTGACAA
Amorce T1rev	1153<1172	TGACCTGCCAAAGTTCAAGC
Amorce T2	1907>1927	AGAGCTGGAGAGAGGGGTTCA
Amorce T2rev	2636<2655	CTGGATCGTCTTTGCACTCC
Amorce T3	2726>2746	ATGAGGATGATCTATTCACTG
Amorce T3rev	3402<3424	CTCAGTTGCCCTTGCTCCTAAGT
Amorce T4	3506>3524	CACCACCTATCAGCAGGCG
Amorce T4rev	4060<4086	ATGTGACTTCTGGATTCTCCCATGAGC
Amorce T5	4414>4434	ACGATGACCAAGGCCTGTTC
Amorce T5rev	5208<5229	TGCCGGTTGTGTGCAGGAGGGA
Amorce T6	5208>5229	TCCCTCCTGCACACAACCGGCA
Amorce T6rev	6020<6041	CTGTACTGCCAGTATGGTCTCC
Amorce T7	6019>6041	AGGAGACCATACTGGCAGTACAG
Amorce T7rev	6777<6799	GTCACCTCCATCCACCTCAACTAC
Amorce T8	7495>7516	GGATCAGGCTTCACCGGGCCAC
Amorce T8rev	8344<8367	TCTCCACCATGAGGTGAGAGGTAG
Amorce T9	8626>8645	TGATACCTCACCTATCTGGC
Amorce T9rev	8966<8993	TCGAACTGGGTAGAAGTAAGATGATGAG
Amorce T10	9224>9242	CACCTCAGCAGCACAACCCA
Amorce T10rev	9652<9679	ACTCTCTTAAGACAATCCAGTACCTGGT
Amorce T11	11401>11420	TCTACGTCAGTGATCCCGCAT
Amorce T11rev	11890<11914	GCGATAGTTGTTGCAATATTGCTGC
Amorce T12	12030>12055	GATGTCGTGGCACCAGTATCGAGAA
Amorce T12rev	12735<12754	CATCGATTTCGTAGCCGTTTCATCGATTTC
Amorce T13	13119>13143	ACTCCAGTCTCTACATCCACCAACC
Amorce T13rev	13363<13384	TCCACGTGCAGGTGTAGCACTG
Amorce T14	13462>13487	TATGCACAAACCTCTTATCTACGAC
Amorce T14rev	13955<13980	CAGTGACATGTAAATTCTGTGTATCT
Amorce T15	14244>14263	TCCGGGATCTCATGGAACAC
Amorce T15rev	14878<14902	GTCTGAATGTTACTGATTATATCT
Amorce T16	14878>14902	AGTATATAATCAGTAACATTGAGAC
Amorce T16rev	15350<15372	CAAGGATTTTCTCAATAGGAGTT
Primer SP1	15525>15545	ATGTTCCACCCCTACCCAGTA
Primer SP2	15673>15545	TAACCTTTGACTTACACAGTAA
NP63	315<334	ACCGGCGTGATGATCAGCAT
PN340R	367<389	ATCATCTGTGATCCGCTGTATCA

Results

In this work a total of 30 samples were sequenced. Among the full genomes obtained, 11 out of 22 were swabs samples, 4 out of 7 were tissue samples, and one sample was an isolated virus in which the viral nucleocapsid was captured in a previous step as described in Material and Methods.

A total of 24,000,000 reads were obtained from the 30 multiplexed samples. PPR reads represented 4.3% of total reads namely, 1,033,754 sequences of 150 bp (reads). Therefore for 16 of the 30 samples, we were able to assemble contigs covering the majority of the genome sequence but with remaining small gaps throughout this genome. The coverage of the 16 genomes reached 75% to 96% of the total genome length.

Analysis of alignment of genomes shows that : *i*) for all genomes, 5' ends containing the trailer are missing; *ii*) gaps are distributed unevenly on the genome; *iii*) regions between 1800 and 2600 bp and between 4400 and 6500 bp are those containing most of the gaps; *iv*) for half of the genomes studied 3' ends containing the leader are also missing. Number of reads assigned to each sample is included in Table 5.3. Among the 3 constituted libraries, tag G and H were able to generate a better amount of reads and therefore induced a better percent of coverage of the genome. Conventional sequencing was used to cover the gaps up to 100% of the genomes.

Chapitre 5. Génomes complets et possibilités d'exploitation

Table 5.2 summarizes the number of full genomes generated in this study according to the type of sample analysed. All these sequences are made publically available (ongoing).

TABLE 5.2 – Number of full genomes generated according to the type of sample analysed

Full genome generated (total analysed)	16 (30)
Swabs	11 (22)
Captured virus from tissue sample	4(7)
Isolated virus of Comoros_2012	1 (1)

The Comoros-2012 strain of PPR, isolated on cell culture then immunocaptured, generated a sequence with 94% coverage of the full genome (Figure 5.1). Figure 5.2 shows a representation of gaps in alignment of genomes with the reference genome. Genotyping, according to a previous publication using the 5' end of the N gene, classified the full genomes obtained into lineages II, III and IV (out of the four PPRV lineages).

The genome organization of all 16 consensus genomes was consistent with previously published sequences for PPRV, with a size of 15,948 nt, fulfilling the “rule of six” and a gene order 3'-N-P/V/C-M-F-H-L.

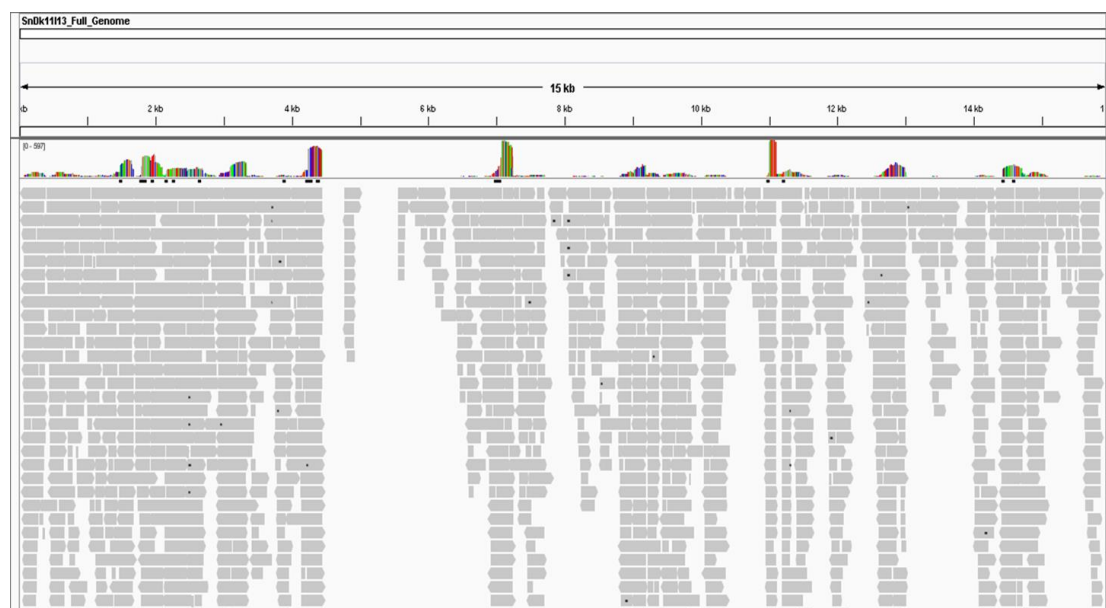


FIGURE 5.1 – Read coverage of PPRV strain of Comoros 2012 on the reference genome

5.1. Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV

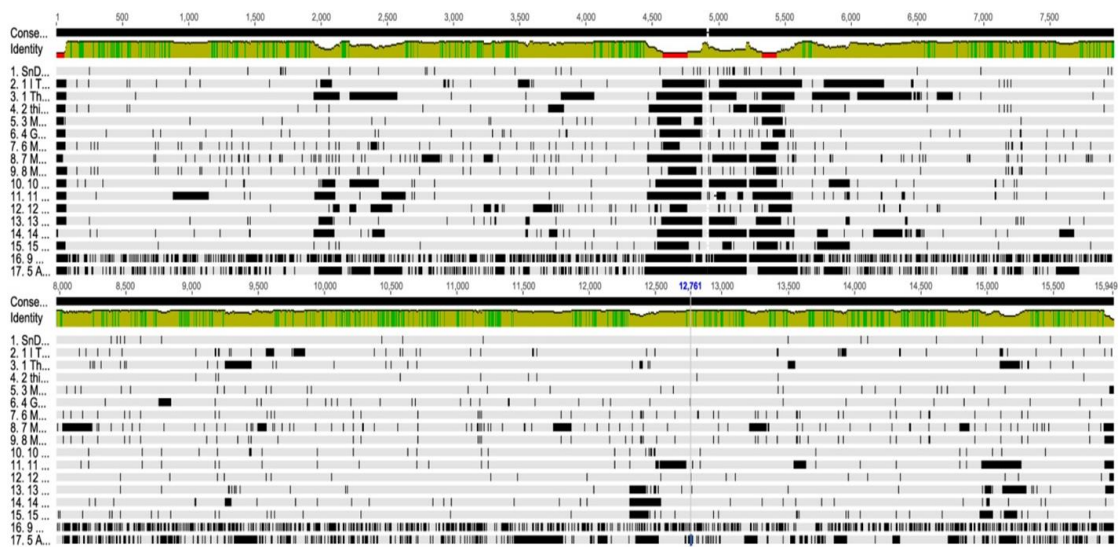


FIGURE 5.2 – Sequences alignment from the 16 genomes against the reference sequence (sample 1 representing virus strain SnDk11I13, lineage II), Samples 16 and 17 respectively represent the strains of Comoros and Algeria (lineage III and Lineage IV) , other strains belong to lineage II

TABLE 5.3 – Results obtained from the analysis of 30 samples (samples coloured in yellow were sequenced above 70% of their genome length)

Full name	Qubit Cone [ng/ µl]	Quantity (copies)	Cr b-actine	PPR Reads	Tag	Type of sample	% viral specific reads
Senegal Louga 1 2012	14.4	6.80E+07	27.16	156	1A	Swab	0.015
Senegal Velor serrere 2012	18.3	3.46E+04	31.59	173	1B	Swab	0.017
Mali Sagabari 2014	15.4	1.10E+05	33.76	398	1C	Lung	0.039
Mali Kolondieba	4.36	1.89E+07	28.62	3228	1D	Swab	0.312
Senegal Kedougou 1 2013	10.4	2.17E+04	34.11	188	1E	Swab	0.018
Senegal Kedougou2 2013	11	3.03E+06	34.29	17	1F	Swab	0.002
Senegal Soum 2012	8	3.91E+05	35.02	148702	1G	Swab	14.385
Mali Kolondieba 4 2014	13.5	1.69E+07	33.12	181312	1H	Swab	17.539
Senegal Ngairing1 2010	11.6	3.10E+05	33.38	652	1I	Swab	0.063
Senegal Tambacounda 14 2012	2.18	1.62E+05	28.67	74	1J	Swab	0.007
Senegal Tambacounda 1 2012	13.4	1.67E+06	27.47	72	2A	Swab	0.007
Mali Kolondieba 6 2014	11.3	1.69E+07	33.03	1018	2B	Swab	0.098
Senegal Joal 2013	20	5.37E+04	33.01	487	2C	Lung	0.047
Senegal Meckeoorg 2013	7.14	9.11E+05	31.95	754	2D	Lung	0.073
Union_of Comoros Ouellah	9.7	2.02E+04	35.05	5477	2E	Isolate	0.530
Mauritanie Tarza 4 2012	4.4	1.63E+05	26.14	134	2F	Swab	0.013
Senegal babagarage 2013	7.38	5.49E+03	32.94	4928	2G	Swab	0.477
Mali Sosorona 1 2014	12.7	4.73E+03	30.83	5307	2H	Swab	0.513
Senegal Foundiougne 60 2012	8.3	3.25E+06	30.3	250	2I	Swab	0.024
Senegal Ngairing 6 2010	2.52	2.50E+06	30.29	1585	2J	Swab	0.153
Senegal Tambacounda 1 2013	11.2	2.21E+05	32.93	208	3A	Lung	0.020
Senegal Tambacounda 2 2013	10.9	2.54E+05	33.68	28	3B	Lung	0.003
Senegal Pakour 2013	9	1.25E+06	33.02	545	3C	Lung	0.053
Senegal Nguekhoh 2 2010	4.34	3.07E+06	34.39	480	3D	Swab	0.046
Senegal Dakar 37 2013	12.1	6.62E+06	34.42	175	3E	Swab	0.017
Algerie	4	5.76E+06	27.74	319	3F	Swab	0.031
Senegal Meckeo3 2012	8	6.27E+05	27.38	334094	3G	Swab	32.319
Mauritanie Tarza 4 2012	12.9	1.63E+05	33.58	340084	3H	Swab	32.898
Senegal Matam 3 2013	3.81	2.99E+05	34.53	101	3I	Lung	0.010
Guinee Dalaba 1	14.5	7.50E+07	28.32	2808	3J	Swab	0.272

Discussion

We report the successful development of a strategy for whole genome sequencing for PPRV. Although full genomes are already published for this virus (Muniraju et al, 2014 ; Dundon et al., 2014 ; Muniraju et al, 2013 ; Bao et al., 2011 ; Chard et al., 2008 ; Bailey et al., 2005), we describe here the first use of the Illumina technology for PPRV sequencing. We applied this technology on two types of clinical samples collected on diseased animal, swabs and tissue sample, while one sample was an isolated virus on cell culture.

Complete genomes sequencing of PPRV by the Illumina method yielded 16 genomes which were complete above 70%. PPRV specific sequences represented 1,033,754 out of 24 million sequences of 150bp, meaning only 4,3% of sequences. All 30 multiplexed samples were expected to provide a minimum level of 35,000 sequences of 150 bp per sample, on the basis that a genome of 16,000 bp represents 106 sequences of 150 bp to ensure 100% coverage. If the number of reads we obtained were evenly distributed along genomes we could theoretically sequence all 30 complete genomes with a reading depth of 330 X along the full genome length (Tableau 5.3).

Our results show that distribution of reads per sample genome is very unbalanced and non-homogeneous between samples. Full genome generation was not dependent either of the viral load as quantified initially, or of the concentration of tagged PCR amplified products.

Several reasons may account for this result : (1) Quality of viral RNA of samples ; indeed, these samples were frozen and thawed and may have contained degraded viral RNA, which also explains difficulty encountered to sequence the entire genes by conventional PCR based on pairs of specific primers ; (2) Effectiveness of tagged random primers, two of them H and G have alone generated 2/3 of the PPR reads achieved. Reasons of the effectiveness on amplification of these tags are not well understood. (3) Inaccessibility of mainly two regions on the genome explaining the lack of corresponding sequences. (4) Absence of purification step in our methodology, except for one strain (Comoros-2012) and use of high throughput technology based on primers with randomized 3' ends could explain 95.7% of non-specific sequences obtained.

Due to the low percentage of viral RNA in relation to host RNA in any given sample, obtaining the required quantity of viral RNA can be difficult. Therefore, isolate Comoros-2012 was depleted from cellular RNA by capturing the nucleocapsid wrapped around the genome using a specific monoclonal ; for this strain the best genome coverage was obtained (93%) as well as sufficient reads (5477) and depth of viral read coverage (50X) (Figure 5.1).

These last results may be also due to the initial high viral load of the isolate and performance of the immunocapture technique on this type of easily purifiable sample. (5) 5' and 3' genomic ends were mostly under-represented in the viral reads obtained. A variety of reasons may be used as comforting explanation, including trimming and assembly processes of reads of in silico programs as well as biological effects such as an over-representation of coding sequences

5.1. Next generation sequencing of peste des petits ruminants viruses belonging to lineages II, III and IV

by mRNA transcripts and also effect of the truncated defective interfering particles (Marston et al., 2013).

The requirement to control the quality of RNA template was investigated using quantitative PCR targeting a small region of the genome, approximately 100 bp. Although satisfactory, the results obtained did not however guarantee the quality of the entire genome. Quantification of cDNA template was investigated through the Nanodrop and the Qubit that were seen as reliable equipment measuring PCR products but gave rather different results.

We did not use the bioanalyser in our study but the benefit of this instrument is to allow visualization of the quality and quantity of the template. A consensual method must therefore be found to measure the concentration of PCR products. We investigated PPR field cases and identified causal viruses using high-throughput sequencing based on random primers with relatively low efficacy, 4.3% of specific reads.

Use of specific primers will certainly improve that performance. Similarly, the use of primers situated near the genomic termini during the cDNA synthesis stages can certainly improve the number of termini sequences, but may not completely resolved the problem (Marston et al., 2013). As we adopted a metagenomic approach to study the small ruminant samples, a mass of data remain to exploit.

Among the generated sequences, a large proportion of them, 95.7% was not exploited. All these sequences may represent either opportunistic pathogens and also highlight the complexity of PPR co-infection or even the discovery of new infectious pathogens identified with a metagenomic approach.

Acknowledgements

We thank the personnel of Virology Laboratory of the Institut Sénégalais de Recherche Agricole (ISRA) and the Senegalese Veterinary Services Direction for their continued support. We also thank Mariam Diop for technical support. This study was partly funded by CIRAD grant ATP Emergence and by the FAO IDENTIFY Project (OSRO/INT/902/USA) aiming at enhancing diagnostic capacity of emerging zoonotic pathogens in geographic 'hot spot' regions. H.S. received a scholarship for a thesis in the South granted by the CIRAD and the AIRD.

References

Adombi CM1, Lelenta M, Lamien CE, Shamaki D, Koffi YM, Traoré A, Silber R, Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Djaman JA, Luckins AG, Diallo A. Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein : a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. J Virol Methods. 2011 May;173(2) :306-13. doi : 10.1016/j.jviromet.2011.02.024. Epub 2011 Mar 1.

Chapitre 5. Génomes complets et possibilités d'exploitation

Albina E, Kwiatek O, Minet C, Lancelot R, Servan de Almeida R, Libeau G. Peste des Petits Ruminants, the next eradicated animal disease? *Vet Microbiol.* 2013 Jul 26;165(1-2) :38-44. doi : 10.1016/j.vetmic.2012.12.013. Epub 2012 Dec 22.

Bailey D, Banyard A, Dash P, Ozkul A, Barrett T. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus Res.* 2005 Jun;110(1-2) :119-24.

Chard LS, Bailey DS, Dash P, Banyard AC, Barrett T. Full genome sequences of two virulent strains of peste-des-petits ruminants virus, the Côte d'Ivoire 1989 and Nigeria 1976 strains. *Virus Res.* 2008 Sep;136(1-2) :192-7. doi : 10.1016/j.virusres.2008.04.018. Epub 2008 Jun 9.

Dhar P, Sreenivasa BP, Barrett T, Corteyn M, Singh RP, Bandyopadhyay SK. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet Microbiol.* 2002 Aug 25;88(2) :153-9.

Dundon WG, Kihu SM, Settypalli TB, Gitao GC, Bebora LC, John NM, Oyugi JO, Silber R, Loitsch A, Diallo A. First Complete Genome Sequence of a Lineage III Peste des Petits Ruminants Virus. *Genome Announc.* 2014 Oct 23;2(5). pii : e01054-14. doi : 10.1128/genomeA.01054-14.

FAO. 2013. Supporting livelihoods and building resilience through Peste des Petits Ruminants (PPR) and small ruminant diseases control. *Animal Production and Health Position Paper*. FAO, Rome. www.fao.org/docrep/017/aq236e/aq236e.pdf (Verified 11 Nov. 2013.)

Kwiatek O, Keita. D., Gil P, Fernández-Pinero J, Jimenez Clavero MA, Albina E, Libeau G. (2010). "Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV." *J Virol Methods.*, 165 :168-77.

Kwiatek O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlsson E, Karimov B, Albina E, Diallo A, Libeau G. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J Comp Pathol.* 2007 Feb-Apr;136(2-3) :111-9. Epub 2007 Feb 23.

Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1754–1760.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2078–2079.

Libeau, G. D., Adama Colas, François Guerre, L. (1994). "Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA." *Veterinary Record* vol.134 : n°12.

Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, David D, de Lamballerie X, Fooks AR. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics.* 2013 Jul 4;14 :444. doi : 10.1186/1471-2164-14-444.

Minet C, Kwiatek O, Keita D, Diallo A, Libeau G, Albina E. Infections à Morbillivirus chez les

5.2. Complete Genome Sequence of a Field Strain of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated during 2010-2014 Epidemics in Senegal

ruminants : la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le nord Virologie 2009, 13 (2) : 103-13

Muniraju M, El Harrak M, Bao J, Ramasamy Parthiban AB, Banyard AC, Batten C, Parida S. Complete Genome Sequence of a Peste des Petits Ruminants Virus Recovered from an Alpine Goat during an Outbreak in Morocco in 2008. Genome Announc. 2013 May 9;1(3). pii : e00096-13. doi : 10.1128/genomeA.00096-13.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. Nat. Biotechnol. 29, 24–26.

Shaila MS, Shamaki D, Forsyth MA, Diallo A, Goatley L, Kitching RP, Barrett T. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. Virus Res. 1996 Aug;43(2) :149-53.

Toussaint JF, Sailleau C, Mast J, Houdart P, Czaplicki G, Demeestere L, VandenBussche F, van Dessel W, Goris N, Bréard E, Bounaadja L, Etienne T, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue in Belgium, 2006. Emerg Infect Dis. 2007 Apr;13(4) :614-6.

Victoria, J.G., Kapoor, A., Li, L., Blinkova, O., Slikas, B., Wang, C., Naeem, A., Zaidi, S., and Delwart, E. (2009). Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. J. Virol. 83, 4642–4651.

5.2 Complete Genome Sequence of a Field Strain of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated during 2010-2014 Epidemics in Senegal

cf. page suivante

Complete Genome Sequence of a Field Strain of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated during 2010-2014 Epidemics in Senegal

Habib Salami,^{a,b} Guillaume Croville,^{c,d} Olivier Kwiatek,^{a,b} Jérôme Mariette,^e Christophe Klopp,^e Sophie Valière,^{f,g} Jean-Luc Guérin,^{c,d} Moustapha Lo,^h Yaya Thiongane,^h Emmanuel Albina,^{i,b} Geneviève Libeau^{a,b}

CIRAD, UMR CMAEE, Montpellier, France^a; INRA, UMR 1309 CMAEE, Montpellier, France^b; Université de Toulouse, INP, ENVT, Toulouse, France^c; INRA, UMR 1225 IHAP, Toulouse, France^d; Plateforme Bioinformatique Toulouse, Midi-Pyrénées, UBIA, INRA, Auzeville Castanet-Tolosan, France^e; INRA, UMR 444 Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, Auzeville, Castanet-Tolosan, France^f; GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville, Castanet-Tolosan, France^g; Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, LNERV, Dakar-Hann, Senegal^h; CIRAD, UMR CMAEE, Petit-Bourg, Guadeloupe, Franceⁱ

Peste des petits ruminants virus (PPRV) infection is expanding and results in regular epizootic activities in Africa, the Middle East, and Asia. Here, we report the complete genome sequence of a field strain of PPRV isolated in Senegal (SnDk11I13) in 2013.

Received 22 July 2014 Accepted 26 August 2014 Published 25 September 2014

Citation Salami H, Croville G, Kwiatek O, Mariette J, Klopp C, Valière S, Guérin J-L, Lo M, Thiongane Y, Albina E, Libeau G. 2014. Complete genome sequence of a field strain of peste des petits ruminants virus isolated during 2010-2014 epidemics in Senegal. *Genome Announc.* 2(5):e00772-14. doi:10.1128/genomeA.00772-14.

Copyright © 2014 Salami et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Geneviève Libeau, genevieve.libeau@cirad.fr.

The recurrent emergence and spread of peste des petits ruminants virus (PPRV) in recent years have been associated with high losses of goat and sheep livestock. In addition to the highly contagious nature of the disease, the rapid spread is attributed to a combination of factors, including human population growth, increased trade, and exchanges of animals and limited implementation of control measures against the disease. The huge health and economic impacts of the disease and the existence of a highly effective vaccine have resulted in recognizing PPRV as the next animal disease to be eradicated after rinderpest.

Analyses of pathological samples collected during different PPR outbreaks in Senegal since 2010 have disclosed the prominent spread of lineage II instead of lineage I, which was formerly the dominant, if not the unique, lineage found in West Africa (1–3). The PPRV genome described here is derived from direct analysis of an eye swab sampled from a goat exhibiting typical clinical symptoms. PPRV whole RNA was extracted from the expurgated swab by using the Viral DNA/RNA isolation kit (Macherey-Nagel) and then processed for next generation sequencing. In brief, first and second strand synthesis and random PCR amplification were performed. PCR products were purified and processed for high throughput sequencing with a MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA) using a paired-end read length of 2×300 nucleotides (nt) with the Illumina MiSeq reagent Kits v3 (Illumina).

After bioinformatics analysis, the remaining nucleotides gaps (4.72% of the genome) localized in N, M, F, and L were filled using conventional reverse transcription and sequenced using specific primers (Cogenics, United Kingdom). The nucleotide sequences of the 3' leader region were determined by rapid amplification of cDNA ends (RACE) (Roche) using specific primers binding in the leader sequence and poly(A) tailing using terminal transferase (TdT) and dATP. Then, the completed genome was realigned against the reference genome (X74443).

Genotyping, according to a previous publication (4) using the 5' end of the N gene, classified the present field strain into lineage II (out of the four PPRV lineages). The genome organization of the strain SnDk11I13 is consistent with previously published sequences for PPRV, with a size of 15,948 nt, fulfilling the “rule of six” and a gene order 3'-N-P/V/C-M-F-H-L-5'. It shares high identity (99.2 to 99.9%) on the complete N gene with other strains sampled in various locations in Senegal during 2010 to 2014. All these strains without exception belong to the same lineage II.

There are currently 11 full genomes of PPRV available, including two vaccine strains, but only 1 is from lineage II (Nigeria 1976 strain). We believe that the availability of more whole-genome sequences as well as relevant epidemiological data related to sampled animals will provide the discriminatory skills needed to establish the diversity of field strains and facilitate source tracking.

Nucleotide sequence accession number. The complete genome sequence of the SnDk11I13 PPRV strain is available at GenBank under the accession no. [KM212177](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KM212177).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the personnel of Virology Laboratory of the Institut Sénégalais de Recherche Agricole (ISRA) and the Senegalese Veterinary Services Direction for their continued support. We also thank Mariam Diop for technical support.

This study was partly funded by CIRAD grant ATP Emergence. H.S. received a scholarship for a thesis in the South (ARTS) granted by the CIRAD and the AIRD.

REFERENCES

1. Banyard AC, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatek O, Libeau G. 2010. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.* 91:2885–2897. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.025841-0>.
2. Kwiatek O, Ali YH, Saeed IK, Khalafalla AI, Mohamed OI, Obeida AA,

- Abdelrahman MB, Osman HM, Taha KM, Abbas Z, El Harrak M, Lhor Y, Diallo A, Lancelot R, Albina E, Libeau G. 2011. Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 17:1223–1231. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101216>.
3. El Arbi AS, El Mamy AB, Salami H, Isselmou E, Kwiatek O, Libeau G, Kane Y, Lancelot R. 2014. Peste des petits ruminants virus, Mauritania. *Emerging Infect. Dis.* 20(2):334–336. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2002.131345>.
4. Kwiatek O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlsson E, Karimov B, Albina E, Diallo A, Libeau G. 2007. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J. Comp. Pathol.* 136:111–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.12.002>.

5.3 Synthèse

Ce chapitre est une ouverture sur l'utilisation d'une résolution maximale comprenant des génomes complets dans l'analyse de la diversité moléculaire. Il décrit nos travaux de séquençage "de génomes complets" des PPRV par la technologie Illumina Mi-seq à partir d'ARN provenant d'échantillons de terrain.

Ce nouvel angle de recherche permet de s'affranchir de l'isolement et de la culture des souches virales et, de facto, d'avoir accès aux séquences en acides nucléiques. Une mise au point des techniques de multiplexage des bibliothèques s'avère cependant nécessaire afin d'optimiser la couverture des génomes. En effet, nos résultats montrent que la distribution des lectures par génome est non-homogène et assez déséquilibrée au sein des échantillons. La production des génomes complets n'était pas dépendante de la charge virale initialement quantifiée et de la concentration des produits PCR tagués.

Par ailleurs, une importante masse de données parmi les séquences générées (95%) reste à exploiter au cours d'études complémentaires. Cela n'a pas été réalisé faute d'expérience en gestion bioinformatique des mégadonnées. L'augmentation des quantités de données générées et la puissance des algorithmes d'analyse amélioreront sans doute très rapidement la pertinence et l'accessibilité de ces outils permettant la détection et la caractérisation des virus, ainsi que le séquençage complet de leur génome.

En ce qui nous concerne, la disponibilité des génomes complets ainsi que celle des données épidémiologiques peuvent fournir une résolution phylogénétique maximale pour établir la diversité des souches sauvages de PPRV et faciliter leur traçabilité.

6 Discussion générale - Conclusion Perspectives

La lutte contre les maladies animales transfrontalières est un énorme défi pour le développement des productions animales en Afrique. La PPR constitue la maladie virale la plus meurtrière des ovins et des caprins. La surveillance et le contrôle de cette maladie reposent avant tout sur un diagnostic clinique et une confirmation au laboratoire. Dans les pays endémiques de PPR où la surveillance épidémiologique est de type événementiel, les foyers sont largement sous-déclarés. Ce processus de déclaration suivi de diagnostic est pourtant essentiel pour caractériser les souches virales présentes dans ces régions car il donne la possibilité de comprendre l'écologie des virus responsables et d'établir les hypothèses épidémiologiques de leur transmission et de leur circulation. Cependant dans les pays tropicaux d'élevage extensif, dans lesquels l'identification et la traçabilité animale sont inexistantes, il est extrêmement difficile d'établir les circuits de diffusion des animaux et des virus.

Ces raisons nous ont conduit à utiliser la diversité génétique du virus comme marqueur de diffusion épidémiologique. Nous avons dans un premier temps exploité la variabilité génétique du PPRV observée sur les courts fragments du gène de la nucléoprotéine pour mettre en évidence la prédominance de la lignée II de PPRV dans l'ouest-africain. L'utilisation de cette région génétique variable est toutefois restreinte lorsqu'il s'agit de discriminer les souches d'une même lignée et établir leur histoire évolutive.

Dans un second temps, nous avons axé notre étude sur des gènes entiers pour retracer les processus de transmission des souches virales dans la sous-région Ouest-africaine. Une étude à grande échelle de la diversité génétique de PPRV sur un large territoire centré sur le Sénégal a ainsi été entreprise. La vitesse d'évolution de PPRV est telle que la diversité génétique actuelle, sous 4 lignées, est une histoire très contemporaine acquise à partir de la fin du 19^{ème} siècle. Aussi, les informations moléculaires obtenues à partir des souches de PPRV prélevées sur 4 ans, de 2010 à 2014, ont permis d'estimer la vitesse d'évolution de ces virus. Cela montre qu'il est possible, sur une période aussi courte d'établir les divergences génétiques récentes des PPRV, d'estimer leur date d'apparition au Sénégal et de reconstruire de façon détaillée leurs mouvements dans cette région particulière d'Afrique. L'originalité de notre étude réside dans

le fait qu'elle est contemporaine à l'établissement de la lignée II dans son bassin d'extension ouest africain car nous avons estimé à **2005**, la date d'installation des premières souches de cette lignée dans la zone d'étude. Les mouvements trans-africains à l'origine du déplacement est-ouest de la lignée II trouvent leur origine dans le commerce de bétail à la croisée des frontières, une évidence économique et culturelle en Afrique de l'Ouest.

Ces résultats constituent un outil de prise de décision pour les institutions régionales en charge de la surveillance et du contrôle de la peste des petits ruminants. Ils impliquent la mise en place d'une stratégie de lutte régionale voire mondiale à l'instar de celle qui fut menée pour l'éradication de la peste bovine. La PPR a été récemment désignée par l'OIE et la FAO, comme la prochaine maladie animale devant être éradiquée. En prélude à cette éradication, une amélioration du contrôle de la maladie pourrait en diminuer l'incidence dans les zones atteintes. Le constat actuel est que les 4 lignées virales sont présentes en Afrique, avec une forte prédominance des lignées II et IV acquise à la faveur d'une conquête rapide des territoires et au détriment des lignées I et III que l'on pense en voie de disparition. Un tel phénomène pourrait s'expliquer par une intensité des mouvements animaux en Afrique subsaharienne associée à une virulence plus forte des lignées II et IV maintenant présentes dans de vastes zones.

L'observation dans l'ouest africain d'une diversité génétique de la lignée II dont l'ampleur n'évolue pas sur 5 années, traduit une situation d'équilibre marquée par l'endémicité de la maladie avec un impact négligeable de la mortalité ou des mesures de lutte prises localement contre la maladie. Pour impacter durablement la persistance du virus, une stratégie de lutte crédible doit être basée sur (1) un recensement animal exhaustif, accompagné d'un marquage des animaux, (2) une vaccination de masse du cheptel régional suivi de campagnes de vaccination ciblées et régulières, (3) du respect des closes sanitaires incluses dans les accords inter-étatiques de transhumance et de commerce animaux. De grands programmes internationaux sont annoncés pour le contrôle et l'éradication des maladies virales considérées comme priorités internationales (PPR, FMD, rage...). Il appartient donc aux responsables de la santé animale de (1) développer une approche intégrée et interdisciplinaire pour répondre aux questions d'épidémiologie classiques et moléculaires ; (2) faire évoluer le concept « One Health » pour conjuguer les compétences dans les domaines de santé humaine et animale ; (3) développer et utiliser de nouveaux outils pour des systèmes de surveillance et de contrôle innovants pour prévenir les foyers infectieux et aider à la prise de décision. Ce dernier point implique non seulement l'utilisation des biotechnologies pour la création vaccins innovant, thermostables et DIVA, mais aussi les approches de séquençage haut-débit, avec ou sans *a priori*, et la métagénomique.

Nous avons dans ce travail initié le séquençage sans *a priori* à haut-débit des génomes de PPR. Ceci ouvre une avenue qui permettra d'obtenir très prochainement un grand nombre de séquences moléculaires, puisqu'il faut rappeler que très peu de séquences de PPRV sont disponibles dans les banques de données. La technique sans *a priori* permet par la même occasion d'obtenir les séquences de tous les pathogènes présents dans un échantillon donné.

Ainsi l'exploitation approfondie des données produites à partir de échantillons ouest-africains que nous avons prélevés sur foyers de PPR pourrait révéler la présence de pathogènes de co-infection comme les pasteurelles les mycoplasmes, ou de nouveaux virus...

Bibliographie

- [1] ABEGUNDE, A. A., AND ADU, F. D. Excretion of the virus of peste des petits ruminants by goats. *Bulletin of animal health and production in Africa* (1977).
- [2] ABUBAKAR, M., ALI, Q., AND KHAN, H. A. Prevalence and mortality rate of peste des petitis ruminant (ppr) : possible association with abortion in goat. *Tropical animal health and production* 40, 5 (2008), 317–321.
- [3] ABUBAKAR, M., JAMAL, S. M., ARSHED, M. J., HUSSAIN, M., AND ALI, Q. Peste des petits ruminants virus (pprv) infection ; its association with species, seasonal variations and geography. *Trop Anim Health Prod* 41, 7 (2009), 1197–202.
- [4] ABUBAKAR, M., RAJPUT, Z. I., ARSHED, M. J., SARWAR, G., AND ALI, Q. Evidence of peste des petits ruminants virus (pprv) infection in sindh ibex (*capra aegagrus blythi*) in pakistan as confirmed by detection of antigen and antibody. *Tropical animal health and production* 43, 4 (2011), 745–747.
- [5] ADOMBI, C. M., LELENTA, M., LAMIEN, C. E., SHAMAKI, D., KOFFI, Y. M., TRAORÉ, A., SILBER, R., COUACY-HYMAN, E., BODJO, S. . C., DJAMAN, J. A., AND OTHERS. Monkey cv1 cell line expressing the sheep–goat slam protein : A highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *Journal of virological methods* 173, 2 (2011), 306–313.
- [6] AKLILU, Y., IRUNGU, P., AND REDA, A. An audit of the livestock marketing status in kenya, ethiopia and sudan. *Community-Based Animal Health and Participatory Epidemiology Unit, Pan African Programme for the Control of Epizootics (PACE), Organization of African Unity/Interafrican Bureau for Animal Resources (AU-IBAR), Nairobi* (2002).
- [7] ALBINA, E., KWIATEK, O., MINET, C., LANCELOT, R., SERVAN DE ALMEIDA, R., AND LIBEAU, G. Peste des petits ruminants, the next eradicated animal disease? *Vet Microbiol* 165, 1-2 (2013), 38–44.
- [8] ANDERSON, J., AND MCKAY, J. A. The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiol Infect.* Feb ;112(1) :225-31. (1994).

- [9] ARUNI, A. W., LALITHA, P. S., MOHAN, A. C., CHITRAVELU, P., AND ANBUMANI, S. P. Histopathological study of a natural outbreak of peste des petits ruminants in goats of tamilnadu. *Small ruminant Research* 28 : 233-40 (1998).
- [10] BAILEY, D., BANYARD, A., DASH, P., OZKUL, A., AND BARRETT, T. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the morbillivirus genus. *Virus Res* 110, 1-2 (2005), 119–24. Bailey, Dalan Banyard, Ashley Dash, Pradyot Ozkul, Aykut Barrett, Tom eng Netherlands 2005/04/23 09 :00 Virus Res. 2005 Jun ;110(1-2) :119-24.
- [11] BALAMURUGAN, V., KRISHNAMOORTHY, P., VEEREGOWDA, B. M., SEN, A., RAJAK, K. K., BHANUPRAKASH, V., GAJENDRAGAD, M. R., AND PRABHUDAS, K. Seroprevalence of peste des petits ruminants in cattle and buffaloes from southern peninsular india. *Trop Anim Health Prod* 44, 2 (2012), 301–6.
- [12] BALAMURUGAN, V., SEN, A., VENKATESAN, G., YADAV, V., BHANOT, V., BHANUPRAKASH, V., AND SINGH, R. Application of semi-quantitative m gene-based hydrolysis probe (taqman) real-time rt-pcr assay for the detection of peste des petits ruminants virus in the clinical samples for investigation into clinical prevalence of disease. *Transboundary and emerging diseases* 57, 6 (2010), 383–395.
- [13] BALAMURUGAN, V., SPRINGH, R., SARAVANAN, P., SEN, A., SARKAR, J., SAHAY, B., RASOOL, T. J., AND SINGH, R. K. Development of an indirect elisa for the detection of antibodies against peste-des-petits-ruminants virus in small ruminants. *Vet Res Commun.*, 31 :355-64. (2007).
- [14] BANYARD, A. C., GRANT, R. J., ROMERO, C. H., AND BARRETT, T. Sequence of the nucleocapsid gene and genome and antigenome promoters for an isolate of porpoise morbillivirus. *Virus Res* 132, 1-2 (2008), 213–9.
- [15] BANYARD, A. C., PARIDA, S., BATTEN, C., OURA, C., KWIATEK, O., AND LIBEAU, G. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J Gen Virol.*, 91 : 2885-97 (2010).
- [16] BAO, J., LI, L., WANG, Z., BARRETT, T., SUO, L., ZHAO, W., LIU, Y., LIU, C., AND LI, J. Development of one-step real-time rt-pcr assay for detection and quantitation of peste des petits ruminants virus. *J Virol Methods* 148, 1-2 (2008), 232–6.
- [17] BAO, J., WANG, Q., PARIDA, S., LIU, C., ZHANG, L., ZHAO, W., AND WANG, Z. Complete genome sequence of a peste des petits ruminants virus recovered from wild bharal in tibet, china. *J Virol.*, Oct;86(19) :10885-6. (2012).
- [18] BAO, J., WANG, Z., LI, L., WU, X., SANG, P., WU, G., DING, G., SUO, L., LIU, C., WANG, J., ZHAO, W., LI, J., AND QI, L. Detection and genetic characterization of peste des petits ruminants virus in free-living bharals (pseudois nayaur) in tibet, china. *Res Vet Sci* 90 :238-40. (2011).

- [19] BARON, M. Wild-type rinderpest virus uses slam (cd150) as its receptor. *J Gen Virol.*, 86 : 1753-57. (2005).
- [20] BARRETT, T., BANYARD, A. C., AND DIALLO, A. *Rinderpest and Peste des Petits Ruminants.*, vol. VI. Elsevier, 2006, journal article Molecular biology of the morbilliviruses, pp. 31-67.
- [21] BARRETT, T., ROMERO, C. H., BARON, M. D., YAMANOUCHI, K., DIALLO, A., BOSTOCK, C. J., AND BLACK, D. The molecular biology of rinderpest and peste des petits ruminants. *Annales de Medecine Veterinaire (Belgium)* (1993).
- [22] BATTEN, C. A., BANYARD, A. C., KING, D. P., HENSTOCK, M. R., EDWARDS, L., SANDERS, A., BUCZKOWSKI, H., OURA, C. C., AND BARRETT, T. A real time rt-pcr assay for the specific detection of peste des petits ruminants virus. *Journal of virological methods* 171, 2 (2011), 401-404.
- [23] BERHE, G., MINET, C., LE GOFF, C., NGANGNOU, A., GRILLET, C., LIBEAU, G., BLACK, D. N., FLEMING, M., BARRETT, T., AND DIALLO., A. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste des petits ruminants and capripox infections. *J. Virol.*, 77 : 1571-77 (2003).
- [24] BIEK, R., HENDERSON, J. C., WALLER, L. A., RUPPRECHT, C. E., AND REAL, L. A. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19 (2007), 7993-8.
- [25] BODJO, S. C., KWIATEK, O., DIALLO, A., ALBINA, E., AND LIBEAU, G. Mapping and structural analysis of b-cell epitopes on the morbillivirus nucleoprotein amino terminus. *J Gen Virol* 88, Pt 4 (2007), 1231-42.
- [26] BODJO, S. C., LELENTA, M., COUACY-HYMAN, E., KWIATEK, O., ALBINA, E., GARGANI, D., LIBEAU, G., AND DIALLO, A. Mapping the peste des petits ruminants virus nucleoprotein : identification of two domains involved in protein self-association. *Virus Res* 131, 1 (2008), 23-32.
- [27] BOXER, E. L., NANDA, S. K., AND BARON, M. D. The rinderpest virus non-structural c protein blocks the induction of type 1 interferon. *Virology* 385, 1 (2009), 134-142.
- [28] BRÜNING-RICHARDSON, A., AKERBLUM, L., KLINGEBORN, B., AND ANDERSON, J. Improvement and development of rapid chromatographic strip-tests for the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *Journal of virological methods* 174, 1 (2011), 42-46.
- [29] BUNDZA, A., AFSHAR, A., DUKES, T., MYERS, D., DULAC, G. C., AND BECKER, S. A. W. E. Experimental peste des petits ruminant (goat plague) in goats and sheep. *Canadian J. Vet. Res.*, 52 : 46-52 (1988).
- [30] CESARO, J.-D., MAGRIN, G., AND NINOT, O. *Atlas de l'élevage au Sénégal*. Paris : Cirad, Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne, Prodig, 2010.

- [31] CÊTRE-SOSSAH, C., KWIATEK, O., FAHAROUDINE, A., SOULÉ, M., MOUTROIFI, Y. O., VREL, M. A., SALAMI, H., RASSOUL, S., ASNAOUI, M., MOINDJIE, Y., ET AL. Impact and epidemiological investigations into the incursion and spread of peste des petits ruminants in the comoros archipelago : An increased threat to surrounding islands. *Transboundary and emerging diseases* (2014).
- [32] CHEN, W., HU, S., QU, L., HU, Q., ZHANG, Q., ZHI, H., HUANG, K., AND BU, Z. A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *Vaccine*, 28 : 4742-50 (2010).
- [33] COTTAM, E. M., HAYDON, D. T., PATON, D. J., GLOSTER, J., WILESMITH, J. W., FERRIS, N. P., HUTCHINGS, G. H., AND KING, D. P. Molecular epidemiology of the foot-and-mouth disease virus outbreak in the united kingdom in 2001. *J Virol* 80, 22 (2006), 11274-82.
- [34] COTTAM, E. M., THEBAUD, G., WADSWORTH, J., GLOSTER, J., MANSLEY, L., PATON, D. J., KING, D. P., AND HAYDON, D. T. Integrating genetic and epidemiological data to determine transmission pathways of foot-and-mouth disease virus. *Proc Biol Sci* 275, 1637 (2008), 887-95.
- [35] COUACY-HYMAN, E., BODJO, S. C., DANHO, T., KOFFI, M., LIBEAU, G., AND DIALLO, A. Early detection of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants virus. *Prev Vet Med.*, 78 :85-8. (2007).
- [36] COUACY-HYMAN, E., ROGER, F., HURARD, C., GUILLOU, J., LIBEAU, G., AND DIALLO, A. Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods* 100, 1 (2002), 17-25.
- [37] DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., AND POSADA, . D. jmodeltest 2 : more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* (2012).
- [38] DEAN, A. S., FOURNIÉ, G., KULO, A. E., BOUKAYA, G. A., SCHELLING, E., AND BONFOH, B. Potential risk of regional disease spread in west africa through cross-border cattle trade. *PloS one* 8, 10 (2013), e75570.
- [39] DELSUC, F., DOUZERY, E., ET AL. Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire : (2) l'approche bayésienne. *Biosystema* 22 (2004), 75-86.
- [40] DESWART, R. L., HARDER, T. C., ROSS, P. S., VOS, H. W., AND OSTERHAUS, A. D. Morbilliviruses and morbillivirus diseases of marine mammals. *Infect Agents Dis. Sep*;4(3) :125-30. (1995).
- [41] DHAR, P., SREENIVASA, B. P., BARRETT, T., CORTEYN, M., SINGH, R. P., AND BANDYOPADHYAY, S. K. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (pprv). *Vet Microbiol* 88, 2 (Aug 2002), 153-159.

- [42] DIALLO, A. La peste des petits ruminants : une maladie longtemps ignorée. *Communication OIE* (2008).
- [43] DIALLO, A., BARRETT, T. AND LEFEVRE, P., AND TAYLOR, W. Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants virus. *J. Gen. Virol.*, 68 : 2033-38 (1987).
- [44] DIALLO, A., BARRETT, T., BARBRON, M., MEYER, G., AND LEFEVRE, P. C. Cloning of the nucleocapsid protein gene of the peste des petits ruminants virus : relationship to other morbilliviruses. *J. Gen. Virol.*, 75 : 233-37. (1994).
- [45] DIALLO, A., MINET, C., LE GOFF, C., BERHE, G., ALBINA, E., LIBEAU, G., AND BARRETT, T. The threat of peste des petits ruminants : progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, 25 : 5591-97. (2007).
- [46] DIEYE, P., AND GUEYE, M. Les systèmes agriculture-élevage au sénégal : importance, caractéristiques et contraintes. *Improving Crop-Livestock Systems in West and Central Africa* (1998), 127.
- [47] DIOP, M., SARR, J., AND LIBEAU, G. Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiology and Infection* 133, 4 (2005), 711-717.
- [48] DIRECTION DES SERVICES VÉTÉRINAIRES DU SÉNÉGAL. Campagne nationale de vaccination du cheptel 2012-2013. Journal article, Ministère de l'élevage et des production animal, 2014.
- [49] DORIG, R. E., MARCIL, A., CHOPRA, A., AND RICHARDSON, C. D. The human cd46 molecule is a receptor for measles virus (edmonston strain). *Cell. Oct 22 ;75(2) :295-305.* (1993).
- [50] DUFFY, S., SHACKELTON, L. A., AND HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses : patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9, 4 (2008), 267-276.
- [51] DUFFY, S., SHACKELTON, L. A., AND HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses : patterns and determinants. *Nature Reviews Genetics* 9, 4 (2008), 267-276.
- [52] EL ARBI, A. S., EL MAMY, A. B., SALAMI, H., ISSELMOU, E., KWIATEK, O., LIBEAU, G., KANE, Y., AND LANCELOT, R. Peste des petits ruminants virus, mauritania. *Emerg Infect Dis* 20, 2 (Feb 2014), 333-336.
- [53] EL-AZAZY, O. M. E., AND SCRIMGEOUR, E. M. Crimean-congo haemorrhagic fever virus infection in the western province of saudi arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91, 3 (1997), 275-278.
- [54] EL-HAG, A. B., AND TAYLOR, W. P. Isolation of peste des petits ruminants virus from sudan. *Res. vet. Sci.*, 36 : 1-4. (1984).

Bibliographie

- [55] EZEIBE, M. C., OKOROAFOR, O. N., NGENE, A. A., EZE, J. I., EZE, I. C., AND UGONABO, J. A. Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats. *Trop Anim Health Prod* 40, 7 (2008), 517–9.
- [56] FORSYTH, M. A., AND BARRETT, T. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterization of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Research* 39 : 151-63 (1995).
- [57] FURLEY, C., TAYLOR, W., AND OBI, T. An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *The veterinary record* 121, 19 (1987), 443–447.
- [58] FURUSE, Y., SUZUKI, A., AND OSHITANI, H. Origin of measles virus : divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virol J* 7 (2010), 52.
- [59] GADAGKAR, S. R., ROSENBERG, M. S., AND KUMAR, S. Inferring species phylogenies from multiple genes : concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 304, 1 (2005), 64–74.
- [60] GARGADENNEC, L., AND LALANNE, A. La peste des petits ruminants. *Bulletin AOF* (1942).
- [61] GIBBS, E. P., TAYLOR, W. P., LAWMAN, M. J. P., AND BRYANT, J. Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus. *Intervirology* 11, 5 (1979), 268–274.
- [62] GILBERT, Y., AND MONNIER, J. Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 15 : 321-35 (1962).
- [63] GUIBERT, B. Acces aux marches et defis damélioration des conditions de vie des communautes pastorales. Journal article, Ministère de l'élevage et des production animal, 2009.
- [64] HAFAR, A., LIBEAU, G., MOUSSA, A., CÉCILE, M., AND DIALLO, A. The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (pprv) and dolphin morbillivirus. *Virus research* 64, 1 (1999), 69–75.
- [65] HAMDY, F. M., DARDIRI, A. H., NDUAKA, D., BREESE, S. S., AND IHAMELANDU, E. C. Etiology of stomatitis pneumocomplex in nigeria dwarf goats. *Canadian J. Comp. Med.*, 40 : 276-84 (1976).
- [66] HARRISON, M. S., SAKAGUCHI, T., AND SCHMITT, A. P. Paramyxovirus assembly and budding : Building particles that transmit infections. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 1416–1429. (2010).
- [67] HASSANEIN, K. M., EL-AZAZY, O. M. E., AND YOUSEF, H. M. Detection of crimean-congo haemorrhagic fever virus antibodies in humans and imported livestock in saudi arabia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91, 5 (1997), 536–537.

- [68] HEANEY, J., BARRETT, T., AND COSBY, S. L. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J. Virol.*, 76 : 3579-84. (2002).
- [69] HEDGES, B., BLAIR, J. E., MARIA, V. L., AND SHOE, J. L. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evolutionary Biology* (2004).
- [70] HOFFMANN, B., WIESNER, H., MALTZAN, J., MUSTEFA, R., ESCHBAUMER, M., ARIEF, F. A., AND BEER, M. Fatalities in wild goats in kurdistan associated with peste des petits ruminants virus. *Transbound Emerg Dis.*, Epub 2011 Nov 10. (2012), Apr ;59(2) :173–6.
- [71] JAGTAP, S. P., RAJAK, K. K., GARG, U. K., SEN, A., BHANUPRAKASH, V., SUDHAKAR, S. B., BALAMURUGAN, V., PATEL, A., AHUJA, A., SINGH, R. K., AND VANAMAYYA, P. R. Effect of immunosuppression on pathogenesis of peste des petits ruminants (ppr) virus infection in goats. *Microb Pathog.*, 52 :217-26. (2012).
- [72] KAMUANGA, M. J., SOMDA, J., SANON, Y., AND KAGONÉ, H. Elevage et marché régional au sahel et en afrique de l'ouest : potentialités et défis. *CSAO/OCDE, Paris* (2008).
- [73] KENNEDY, S. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Pathol, J. Comp* 119, 3 (1998), 201–25. Kennedy, S Journal Article Review England J Comp Pathol. 1998 Oct ;119(3) :201-25.
- [74] KERDILES, Y. M., CHERIE, B., AND MARIE, J. Immunomodulatory properties of morbilli-virus nucleoproteins. *Virol. Immunol* 19 : 324-334. (2006).
- [75] KERDILES, Y. M., SELLIN, C. I., DRUELLE, J., AND HORVAT, B. Immunosuppression caused by measles virus : role of viral proteins. *Rev. Med. Virol.*, 16 : 49-63 (2005).
- [76] KHALAFALLA, A. I., SAEED, I. K., ALI, Y. H., ABDURRAHMAN, M. B., KWIATEK, O., LIBEAU, G., OBEIDA, A. A., AND ABBAS, Z. An outbreak of peste des petits ruminants (ppr) in camels in the sudan. *Acta Trop.*, 116 :161-5 (2010).
- [77] KUL, O., KABAKCI, N., ÖZKUL, A., KALENDER, H., AND ATMACA, H. Concurrent peste des petits ruminants virus and pestivirus infection in stillborn twin lambs. *Veterinary Pathology Online* 45, 2 (2008), 191–196.
- [78] KULKARNI, D. D., BHIKANE, M. S., SHAILA, M. S., VARALAKSHMI, P., APTE, M. P., AND NARLADKAR, B. W. Peste des petits ruminants in goats in india. *Vet Rec.*, 138 :187–188. (1996).
- [79] KUMAR, MAHERCHANDANI, S., KASHYAP, S. K., SINGH, S. V., SHARMA, S., CHAUBEY, K. K., AND LY, H. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants : A comprehensive review. *Viruses* 6, 6 (2014), 2287–2327.
- [80] KWIATEK, O., ALI, Y. H., SAEED, I. K., KHALAFALLA, A. I., MOHAMED, O. I., OBEIDA, A. A., ABDELRAHMAN, M. B., OSMAN, H. M., TAHA, K. M., ABBAS, Z., ET AL. Asian

- lineage of peste des petits ruminants virus, africa. *Emerging infectious diseases* 17, 7 (2011), 1223.
- [81] KWIATEK, O., D., K., GIL, P., J, F.-P., MA, J. C., ALBINA, E., AND LIBEAU, G. Quantitative one-step real-time rt-pcr for the fast detection of the four genotypes of pprv. " *J Virol Methods.*, 165 :168-77. (2010).
- [82] KWIATEK, O., KEITA, D., GIL, P., FERNÁNDEZ-PINERO, J., JIMENEZ CLAVERO, M. A., ALBINA, E., AND LIBEAU, G. Quantitative one-step real-time rt-pcr for the fast detection of the four genotypes of pprv. *Journal of virological methods* 165, 2 (2010), 168–177.
- [83] KWIATEK, O., MINET, C., GRILLET, C., HURARD, C., CARLSSON, E., KARIMOV, B., ALBINA, E., DIALLO, A., AND LIBEAU, G. Peste des petits ruminants (ppr) outbreak in tajikistan. *J Comp Pathol* 136, 2-3 (2007), 111–9.
- [84] LAINE, D., BOURHIS, J. M., LONGHI, S., FLACHER, M., CASSARD, L., CANARD, B., SAUTÉS-FRIDMAN, C., RABOURDIN-COMBE, C., AND VALENTIN, H. Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through ntail-nr and ncore-fcgmariib1 interactions, respectively. *J Gen Virol. Jun ;86(Pt 6) :1771-84.* (2005).
- [85] LANAVE, C., PREPARATA, G., SACONE, C., AND SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of molecular evolution* 20, 1 (1984), 86–93.
- [86] LANCELOT, R., LESNOFF, M., AND MCDERMOTT, J. Use of akaike information criteria for model selection and inference. an application to assess prevention of gastrointestinal parasitism and respiratory mortality of guinean goats in kolda, senegal. *Prev Vet Med.*, 55 :217-40 (2002).
- [87] LEFEVRE, P., AND DIALLO, A. Peste des petits ruminants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 9, 4 (1990), 935–981.
- [88] LEMBO, T., OURA, C., PARIDA, S., HOARE, R., FROST, L., FYUMAGWA, R., KIVARIA, F., CHUBWA, C., KOCK, R., CLEAVELAND, S., AND BATTEN, C. Peste des petits ruminants infection among cattle and wildlife in northern tanzania. *Emerg Infect Dis. Dec;19(12) :2037-40. doi : 10.3201/eid1912.130973.* (2013).
- [89] LEMON, K., MEASMAN, A. W., MCQUAID, S., VAN AMERONGEN G., YUKSEL, S., LUDLOW, M., RENNICK, L. J., KUKEN, T., RIMA, B. K., GEITENBEEK, T. B. H., OSTERHAUS, A. D. M. E., DUPREX, W. P., AND DE SWART R.L. Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog.*, 7 : e1001263. (2011).
- [90] LI, L., BAO, J., WU, X., WANG, Z., WANG, J., GONG, M., LIU, C., AND LI, J. Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* 170, 1-2 (2010), 37–41.
- [91] LIBEAU, GENEVIEVEAND DIALLO, A., COLAS, F., AND GUERRE, L. Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture elisa. *Veterinary Record vol.134 : n°12* (1994).

- [92] LIBEAU, G. *Le diagnostic différentiel expérimental de la Peste Bovine et de la Peste des Petits Ruminants*. PhD thesis, Université de Paris VI, 1998.
- [93] LIBEAU, G., PREHAUD, C., LANCELOT, R., COLAS, F., GUERRE, L., BISHOP, D. H. L., AND DIALLO, A. Development of a competitive elisa for peste des petits ruminants virus antibody detection using a recombinant n protein. *Res. Vet. Sci.*, 58 : 50-55 (1995).
- [94] LILJEROOS, L., HUISKONEN, J. T., ORA, A., SUSI, P., AND BUTCHER, S. J. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *PNAS.*, 108 :18085-90 (2011).
- [95] LIU, F., WU, X., LIU, W., LI, L., AND WANG, Z. Current perspectives on conventional and novel vaccines against peste des petits ruminants. *Vet Res Commun* (2014). Liu, Fuxiao Wu, Xiaodong Liu, Wenhua Li, Lin Wang, Zhiliang ENG 2014/09/17 06 :00 Vet Res Commun. 2014 Sep 16.
- [96] MAGRIN, G. Dynamiques territoriales et place de l'élevage au sénégal - notes de synthèse – n°2. *ATP Icare, Cirad*. (2009).
- [97] MAILLARD, J. C., VAN, K. P., NGUYEN, T., VAN, T. N., BERTHOULY, C., LIBEAU, G., AND KWIATEK, O. Examples of probable host-pathogen co-adaptation/co-evolution in isolated farmed animal populations in the mountainous regions of north vietnam. *Ann NY Acad Sci*. (2008), Dec ;1149 :259–62.
- [98] MANUAL, O. T. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2011. chapter 2.1. 13. rabies. world organisation for animal health, 2012.
- [99] MCCARTHY, A. J., AND GOODMAN, S. J. Reassessing conflicting evolutionary histories of the paramyxoviridae and the origins of respiroviruses with bayesian multigene phylogenies. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 1 (2010), 97–107.
- [100] MELIA, M. M., EARLE, J. P., ABDULLAH, H., REANEY, K., TANGY, F., AND COSBY, S. L. Use of slam and pvr14 and identification of pro-hb-egf as cell entry receptors for wild type phocine distemper virus. *PloS one* 9, 8 (2014), e106281.
- [101] MENG, X., DOU, Y., ZHAI, J., ZHANG, H., YAN, F., SHI, X., LUO, X., LI, H., AND CAI, X. Tissue distribution and expression of signaling lymphocyte activation molecule receptor to peste des petits ruminant virus in goats detected by real-time pcr. *Journal of Molecular Histology*, 42 : 467-72 (2011).
- [102] MEYER, G., AND DIALLO, A. The nucleotide sequence of the fusion protein gene of the peste des petits ruminants virus : the long untranslated region in the 5 -end of the f-protein gene of morbilliviruses seems to be specific to each virus. *Virus research* 37, 1 (1995), 23–35.
- [103] MICHAUD, V., GIL, P., KWIATEK, O., PROMÉ, S., DIXON, L., ROMERO, L., LE POTIER, M., ARIAS, M., COUACY-HYMAN, E., ROGER, F., ET AL. Long-term storage at tropical

- temperature of dried-blood filter papers for detection and genotyping of rna and dna viruses by direct pcr. *Journal of virological methods* 146, 1 (2007), 257–265.
- [104] MINET, C., KWIATEK, O., KEITA, D., DIALLO, A., LIBEAU, G., AND ALBINA, E. Infections à morbillivirus chez les ruminants : la peste bovine en voie d'éradication et la peste des petits ruminants en extension vers le nord. *Virologie*, 13, 2 (2009), 103–113.
- [105] MISSEHOUE, A., LY, H. C., DIEDHIOU, M., TILLARD, E., AND DIOUE, S. Elevage citadin de moutons à dakar : structure et productivité. *8th Conf. Inst. Trop. Vet. Med. Berlin* (25.-29. Sept. 1995), 208–212.
- [106] MONDAL, B., SREENIVASA, B. P., DHAR, P., SINGH, R. P., AND BANDYOPADHYAY, S. K. Apoptosis induced by peste des petits ruminants virus in goat peripheral blood mononuclear cells. *Virus Research*, 73 : 113-119. (2001).
- [107] MORNET, P., GILBERT, Y., ORUE, J., AND THIERY, G. La peste des petits ruminants en Afrique occidentale française, ses rapports avec la peste bovine. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 9, 4 (1956).
- [108] MÜHLEBACH, M. D., MATEO, M., SINN, P. L., PRÜFER, S., UHLIG, K. M., LEONARD, V. H. J., NAVARATNARAJAH, C. K., FRENZKE, M., WONG, X. X., SAWATSKY, B., RAMACHANDRAN, S., MCCRAY, JR, P. B., CICHUTEK, K., VON MESSLING, V., LOPEZ, M., AND CATTANEO, R. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480, 7378 (Dec 2011), 530–533.
- [109] MUNIR, M., ZOHARI, S., AND BERG, M. Replication and virulence determinants of peste des petits ruminants virus. In *Molecular Biology and Pathogenesis of Peste des Petits Ruminants Virus*. Springer, 2013, pp. 23–32.
- [110] MUNIRAJU, M., MUNIR, M., PARTHIBAN, A. R., BANYARD, A. C., BAO, J., WANG, Z., AYEBAZIBWE, C., AYELET, G., EL HARRAK, M., MAHAPATRA, M., LIBEAU, G., BATTEN, C., AND PARIDA, S. Molecular evolution of peste des petits ruminants virus. *Emerging Infectious Diseases* 20, 12 (2014), 2023–2033.
- [111] MUNOZ-ALIA, M. A., FERNANDEZ-MUNOZ, R., CASASNOVAS, J. M., PORRAS-MANSILLA, R., SERRANO-PARDO, A., PAGAN, I., ORDOBAS, M., RAMIREZ, R., AND CELMA, M. L. Measles virus genetic evolution throughout an imported epidemic outbreak in a highly vaccinated population. *Virus research* (2014).
- [112] NANDA, S. K., AND BARON, M. D. Rinderpest virus blocks type i and type ii interferon action : role of structural and non-structural proteins. *J Virol.*, 80 :7555-68 (2006).
- [113] NANICHE, D., WILD, T. F., C, R.-C., AND GERLIER, D. A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J Gen Virol. Oct;73 (Pt 10) :2617-24.* (1992).

- [114] NERSY, C. F. M. *Les Petits ruminants dans la région du Sine-Saloum au Senegal : enquête socio-économique : proposition d'amélioration*. Association des Elèves ENVT, 1988.
- [115] NOVELLA, I. S., BALL, L. A., AND WERTZ, G. W. Fitness analyses of vesicular stomatitis strains with rearranged genomes reveal replicative disadvantages. *Journal of virology* 78, 18 (2004), 9837–9841.
- [116] NOYCE, R. S., BONDRE, D. G., HA, M. N., LIN, L. T. AND SISSON, G., TSAO, M. S., AND RICHARDSON, C. D. Tumor cell marker pvr14 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* 7, e1002240. (2011).
- [117] NOYCE, R. S., DELPEUT, S., AND RICHARDSON, C. D. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology, in press* (2012).
- [118] OBI, T., OJO, M., DUROJAIYE, O., KASALI, O., AKPAVIE, S., AND OPASINA, D. Peste des petits ruminants (ppr) in goats in nigeria : clinical, microbiological and pathological features. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* 30, 1-10 (1983), 751–761.
- [119] OHNO, S., ONO, N., TAKEDA, M., TAKEUCHI, K., AND YANAGI, Y. Dissection of measles virus v protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol.* 85 : 2991-99. (2004).
- [120] OSTERHAUS, A. D. M. E., DE SWART R.L., AND ET AL., V. H. Morbillivirus infections of aquatic mammals : newly identified members of the genus. *Vet. Microbiol.*, 44 : 219-227. (1995).
- [121] OUAGAL, M., HENDRIKX, P., BERKVEN, D., NCHARÉ, A., Cissé, B., AKPELI, P., SORY, K., AND SAEGERMAN, C. Les réseaux d'épidémiosurveillance des maladies animales en afrique francophone de l'ouest et du centre. *Revue scientifique et technique-Office international des épizooties* 27, 3 (2008), 689–702.
- [122] PADHI, A., AND MA, L. Genetic and epidemiological insights into the emergence of peste des petits ruminants virus (pprv) across asia and africa. *Sci Rep* 4 (2014), 7040.
- [123] PAGAN, I., HOLMES, E. C., AND SIMON-LORIERE, E. Level of gene expression is a major determinant of protein evolution in the viral order mononegavirales. *J Virol* 86, 9 (2012), 5253–63.
- [124] PAUL, M. *Sénégal, un système de santé animale en voie de privatisation*. PhD thesis, École vétérinaire de Maisons-Alfort, 2005.
- [125] PAWAR, R. M., DHINAKAR, R. G., AND BALACHANDRAN, C. Relationship between the level of signaling lymphocyte activation molecule mrna and replication of peste-des-petits-ruminants virus in peripheral blood mononuclear cells of host animals. *Acta Virol.* 52 :231-6. (2008).

Bibliographie

- [126] PEGRAM, R., AND TEREKE, F. Observation on the health of afar livestock. *Ethiopian Vet J* 5 (1981), 11–4.
- [127] PÉLISSIER, P., AND BÂ, C. *Atlas du Sénégal*. Éditions Jeune Afrique, 1983.
- [128] POMEROY, L. W., BJORNSTAD, O. N., AND HOLMES, E. C. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. *J Mol Evol* 66, 2 (2008), 98–106.
- [129] PYBUS, O. G., AND RAMBAUT, A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet* 10, 8 (2009), 540–50.
- [130] RAJAK, K. K., SREENIVASA, B. P., HOSAMANI, M., SINGH, R. P., SINGH, S. K., SINGH, R. K., AND BANDYOPADHYAY, S. K. Experimental studies on immunosuppressive effects of peste des petits ruminants (ppr) virus in goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, 28 :287-96. (2005).
- [131] RAOULT, D., AUDIC, S., ROBERT, C., ABERGEL, C., RENESTO, P., OGATA, H., LA SCOLA, B., SUZAN, M., AND CLAVERIE, J.-M. The 1.2-megabase genome sequence of mimivirus. *Science* 306, 5700 (2004), 1344–1350.
- [132] REY, N. J., AND MCCULLOUGH, K. C. Rinderpest virus isolates of different virulence vary in their capacity to infect bovine monocytes and macrophages. *J Gen Virol.*, 78 :1875-84 (1997).
- [133] RODRIGUEZ, F., OLIVER, J., MARIN, A., AND MEDINA, J. R. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of theoretical biology* 142, 4 (1990), 485–501.
- [134] RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M. A., AND HUELSENBECK, J. P. Mrbayes 3.2 : efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61, 3 (2012), 539–542.
- [135] ROSSITER, P. Rinderpest. *Infectious diseases of Livestock with special reference to Southern Africa* 2 (1994), 735–757.
- [136] ROSSITER, P. B., JESSETT, D. M., AND TAYLOR, W. P. Microneutralisation systems for use with different strains of peste des ptits ruminants and rinderpest virus. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 17 : 75-81 (1985).
- [137] ROUX, L. Dans le genome des paramyxovirinae, les promoteurs et leurs activites sont façonnées par la regle de six. *Virologie*, 9, 1 (2005), 19–34.
- [138] SALAMI, H. Epidémiologie de la peste des petits ruminants au sénégäl. Journal article, Université Montpellier 2, 2010.
- [139] SALIKI, J. TAND HOUSE, J. A., MEBUS, C. A., AND DUBOVI, E. J. Comparison of monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and virus isolation for detection of peste des petits ruminants virus in goat tissues and secretions. *J Clin Microbiol.*, 32 :1349-53. (1994).

- [140] SATO, H., YONEDA, M., HONDA, T., AND KAI, C. Morbillivirus receptors and tropism : multiple pathways for infection. *Front Microbiol* 3 (2012), 75.
- [141] SCHLENDER, J., SCHNORR, J., SPIELHOFFER, P., CATHOMEN, T., CATTANEO, R., BILLETTER, M., AND S., S.-S. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *PNAS*, 93 : 13194-99 (1996).
- [142] SCHNEIDER-SCHAULIES, S., NIEWIESK, S., J., S.-S., AND TER MEULEN V., V. Measles virus induced immunosuppression : targets and effector mechanisms. *Curr. Molec. Med.* 1 : 163-181. (2001).
- [143] SCHOLLE, S. O., YPMA, R. J., LLOYD, A. L., AND KOELLE, K. Viral substitution rate variation can arise from the interplay between within-host and epidemiological dynamics. *The American naturalist* 182, 4 (2013), 494–513.
- [144] SEN, A., SARAVANAN, P., BALAMURUGAN, V., RAJAK, K. K., SUDHAKAR, S. B., BHANUPRAKASH, V., PARIDA, S., AND SINGH, R. K. Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Rev Vaccines*. Jul;9(7) :785-96. (2010).
- [145] SETH, S., AND SHAILA, M. S. The hemagglutinine neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus is biologically active when transiently expressed in mammalian cells. *Research Virus*, 75 : 169–177. (2001).
- [146] SHAFER, J. A., BELLINI, W. J., AND ROTA, P. A. The c protein of measles virus inhibits the type i interferon response. *Virology*, 315 : 389-97 (2003).
- [147] SHAILA, M., PURUSHOTHAMAN, V., BHAVASAR, D., VENUGOPAL, K., AND VENKATESAN, R. Peste des petits ruminants of sheep in india. *Veterinary Record* 125, 24 (1989), 602–602.
- [148] SHAILA, M., SHAMAKI, D., FORSYTH, M. A., DIALLO, A., GOATLEY, L., KITCHING, R., AND BARRETT, T. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants viruses. *Virus research* 43, 2 (1996), 149–153.
- [149] SHAILA, M. S., SHAMAKI, D., FORSYTH, M. A., DIALLO, A., GOATLEY, L., KITCHING, R. P., AND BARRETT, T. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Res. Aug;43(2) :149-53*. (1996).
- [150] SHARP, P. M., AND HAHN, B. H. Origins of hiv and the aids pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, 1 (2011), a006841.
- [151] SHOEMAKER, T., BOULIANNE, C., VINCENT, M. J., PEZZANITE, L., AL-QAHTANI, M. M., AL-MAZROU, Y., KHAN, A. S., ROLLIN, P. E., SWANEPOEL, R., KSIAZEK, T. G., ET AL. Genetic analysis of viruses associated with emergence of rift valley fever in saudi arabia and yemen, 2000-01. *Emerging infectious diseases* 8, 12 (2002), 1415.
- [152] SHOKRALLA, S., SPALL, J. L., GIBSON, J. F., AND HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental dna research. *Mol Ecol* 21, 8 (2012), 1794–805.

Bibliographie

- [153] SINGH, R. P., SREENIVASA, B. P., DHAR, P., SHAH, L. C., AND BANDYOPADHYAY, S. K. Development of a monoclonal antibody based competitive-elisa for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (ppr) virus. *Veterinary microbiology* 98, 1 (2004), 3–15.
- [154] SWAI, E. S., KAPAGA, A., KIVARIA, E., TINUGA, D., JOSHUA, G., AND SANKA, P. Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus antibodies in various districts of tanzania. *Vet Res Commun* 33, 8 (2009), 927–36.
- [155] SY, O. Mobilité transfrontalière source de conflit au ferlo (sénégal). *M@ppemonde* 98, 26 (2010).
- [156] TAKAYAMA, I., SATO, H., WATANABE, A., OMI-FURUTANI, M., SUGAI, A. KANKI, K., YONEDA, M., AND KAI, C. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424 :45-55 (2012).
- [157] TAMURA, K., AND NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial dna in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10, 3 (1993), 512–526.
- [158] TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., AND KUMAR, S. Mega6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30, 12 (2013), 2725–2729.
- [159] TATSUO, H., ONO, N., TANAKA, K., AND YANAGI, Y. Slam (cdw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 406 : 893–897 (2000).
- [160] TAYLOR, W. The distribution and epidemiology of ppr. *Prev Vet Med Volume 2*, Issues 144 (1984), Pages 157–166.
- [161] TAYLOR, W. P., AND ABEGUNDE, A. The isolation of peste des petits ruminants virus from nigerian sheep and goats. *Res Vet Sci. Jan;26(1) :94-6.* (1979).
- [162] TAYLOR, W. P., BUSAIDY, S., AND BARRETT, T. The epidemiology of peste des petits ruminants in the sultanate of oman. *Vet Microbiol May;22(4) :341-52.* (1990).
- [163] TOPLU, N., OGUZOGLU, T. C., AND ALBAYRAK, H. Dual infection of fetal and neonatal small ruminants with border disease virus and peste des petits ruminants virus (pprv) : neuronal tropism of pprv as a novel finding. *J Comp Pathol.*, May;146(4) :289-97. (2012).
- [164] UA-BIRA. Rapport d'étape sur le contrôle progressif de la ppr. Journal article, Union Africaine - Bureau Interafricain des Ressources Animales, 2013.
- [165] WANG, S., LUO, X., WEI, W., ZHENG, Y., DOU, Y., AND CAI, X. Calculation of evolutionary correlation between individual genes and full-length genome : A method useful for choosing phylogenetic markers for molecular epidemiology. *PloS one* 8, 12 (2013), e81106.

- [166] WERTZ, G. W., PEREPELTSIA, V. P., AND BALL, L. A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand rna virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7 (1998), 3501–3506.
- [167] WOHLSEIN, P., WAMWAYI, H. M., TRAUTWEIN, G., POHLENZ, J., LIESS, B., AND BARRETT, T. Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicities. *Vet. Microbiol.*, 44 : 141-149. (1995).
- [168] WOMA, T. Y., DUNDON, W. G., YU, D., ADOMBI, C. M., QASIM, A. M., SABI, A. A., ABRAHAM, M. N., OLAIYA, O. D., BAILEY, D., SHAMAKI, D., LOITSCH, A., QUAN, M., AND DIALLO, A. Identification of peste-des-petits ruminants virus (pprv) lineage iv, the asian lineage, in nigeria and co-circulation with pprv lineage ii. *Vet Microbiol* (2014).
- [169] WOO, P. C., LAU, S. K., WONG, B. H., FAN, R. Y., WONG, A. Y., ZHANG, A. J., WU, Y., CHOI, G. K., LI, K. S., HUI, J., WANG, M., ZHENG, B. J., CHAN, K. H., AND YUEN, K. Y. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *A, Proc Natl Acad Sci U. S.* 109, 14 (2012), 5435–40.
- [170] YANAGI, Y., TAKEDA, M., AND OHNO, S. Measles virus : cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.*, 87 : 2767-79 (2006).
- [171] YEH, J. Y., LEE, J. H., SEO, H. J., PARK, J. Y., MOON, J. S., CHO, I. S., CHOI, I. S., PARK, S. Y., SONG, C. S., AND LEE, J. B. Simultaneous detection of rift valley fever, bluetongue, rinderpest, and peste des petits ruminants viruses by a single-tube multiplex reverse transcriptase-pcr assay using a dual-priming oligonucleotide system. *J Clin Microbiol* 49, 4 (2011), 1389–94.



Publications

were positive for the hemagglutinin (HA) and neuraminidase genes of avian influenza A (H7N9) virus. Of 6 environmental samples, 5 were positive for (H7N9) virus HA genes. No (H7N9) virus HA antibodies were detected from paired serum samples from all 18 close contacts.

Two virus strains were isolated: 1 from a patient specimen (A/Zhenjiang/1/2013) and 1 from a chicken cage specimen (A/environment/Zhenjiang/4/2013) (GenBank accession nos. KF007057–KF007064 and KF007009–KF007016, respectively). Genome comparison showed that isolates had a nucleotide identity of 96.8%–99.8%, indicating an amino acid identity of 98.2%–99.6%. Phylogenetic analysis showed that 5 genes (HA, nucleoprotein, neuraminidase, matrix, and nonstructural protein) of the 2 isolates belonged to the same clade. However, the 3 polymerase genes (polymerase basic 1, polymerase basic 2, and polymerase acidic) clustered in a different clade. These results suggested that the 2 strains originated from an independent reassortment mechanism and that the H7N9 subtype viruses had undergone genetic reassortment to generate multiple novel genotypes in China.

According to epidemiologic and clinical data for infections with avian influenza A(H7N9) virus, most patients with severe illness, including severe pneumonia and acute respiratory distress syndrome, were elderly men with underlying medical conditions (2,3). Our findings suggest that pregnancy might be a risk factor for clinically severe influenza in young women infected with H7N9 subtype virus.

M.-h.Z. and H.W. were partially supported by the Innovation Platform for Public Health Emergency Preparedness and Response (NO.ZX201109); X.Q. was partially supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20131450);

and X.Q., L.C., and Y.Z. were partially supported by the Jiangsu Province Key Medical Talent Foundation (RC2011084, RC2011085, and RC2011191) and the 333 Projects of Jiangsu Province.

**Xian Qi,¹ Lunbiao Cui,¹
Ke Xu,¹ Bin Wu, Fenyang Tang,
Changjun Bao, Yefei Zhu,
Ming-hao Zhou, and Hua Wang**

Author affiliation: Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, China

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2002.131109>

References

1. Belser JA, Bridges CB, Katz JM, Tumpey TM. Past, present, and possible future human infection with influenza virus A subtype H7. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:859–65. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1506.090072>
2. Gao HN, Lu HZ, Cao B, Du B, Shang H, Gan JH, et al. Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection. *N Engl J Med.* 2013;368:2277–85. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1305584>
3. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 2013;368:1888–97. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1304459>
4. Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, Callaghan WM, et al. Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA.* 2010;303:1517–25. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.479>

Address for correspondence: Hua Wang, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, 172 Jiangsu Rd, Nanjing 210009, China; email: hua@jscdc.cn

¹These authors contributed equally to this article.

All material published in *Emerging Infectious Diseases* is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.

Peste des Petits Ruminants Virus, Mauritania

To the Editor: Peste des petits ruminants virus (PPRV; genus *Morbivirus*, family *Paramyxoviridae*) causes severe infectious disease in sheep and goats in Africa and Asia. Pneumo-enteritis clinical signs are dominated by ocular and nasal discharge, and mortality rates are high (1). Four distinct lineages of PPRV have been described on the basis of a phylogenetic analysis of a cDNA fragment of the nucleoprotein (NP) gene (2): lineages I and II are found in western Africa (1,3,4), lineage III in eastern Africa and the Middle East, and lineage IV in Asia. Recent studies have shown changes in this distribution (1,5), including the emergence of PPRV lineage IV in northeastern and northern Africa (5). Sparse serologic results (6,7) are available regarding PPRV spread in Mauritania or genetic features of circulating PPRV strains.

A seroprevalence survey was implemented in October 2010 to assess PPRV spatial distribution in Mauritania. The study was limited to 8 southern provinces (*wilayas*), which covered 99.3% of the national sheep and goat stocks (online Technical Appendix Figure 1, wwwnc.cdc.gov/EID/article/20/2/13-1345-Techapp1.pdf). Of 40 districts (*mougataas*), 21 were randomly selected. A single geographic point was randomly sampled within each of the selected *mougataas*, and 100 small ruminants were sampled in a 7-km radius around the coordinates. None of the *mougataas* in which sampling occurred had a PPRV vaccination program.

In addition, field veterinary officers from Trarza and Tagant Provinces were asked to report suspected outbreaks of peste des petits ruminants disease (PPR) during January–March 2012. All outbreaks were investigated, and biologic samples were collected for laboratory diagnostics.

All serum samples from the 2010 and 2012 surveys were analyzed by using antibody ELISA ID Screen PPR competition (IDvet Innovative Diagnostics, Grabels, France). Optical density values were converted to inhibition percentages; according to the ELISA cutoff value, inhibition percentages of $\leq 45\%$ were considered positive. A logistic beta-binomial regression model was used to analyze prevalence rates within mougataas. Swab samples were tested by using reverse transcription PCR (RT-PCR) adapted to a 1-step format (OneStep RT-PCR Kit; QIAGEN, Hilden, Germany) and based on nucleoprotein (NP) 3–NP4 PPRV-specific primers targeting the 3' end of the NP gene (8). Amplicons of 351 nt were extracted, and after sequencing, nucleic acid segments were aligned with PPRV sequences stored in the database of the Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Montpellier, France) or retrieved from GenBank (Figure).

A total of 1,190 sheep and 714 goat serum samples were collected during the 2010 survey; the estimated serologic PPRV prevalence rate was 43% ($n = 1,904$; 95% CI 38%–47%). PPRV infection was widespread: prevalence rates ranged from 3% (Guerou) to 98% (Kobeni) (online Technical Appendix Figure 2). No significant difference was found by species or animal age ($p = 0.28$ and $p = 0.92$, respectively), but an increasing gradient in prevalence rates was observed from north to south; the effect of latitude was significant ($p < 10^{-6}$) (online Technical Appendix Table). The increasing prevalence rates moving from the north to the south might be related to higher small ruminant density in southern Mauritania (pastoral resources), which might increase between-herd transmission. Moreover, the movement of livestock between Mauritania and 2 countries to the south, Mali and Senegal (online Technical Appendix Figure 2),

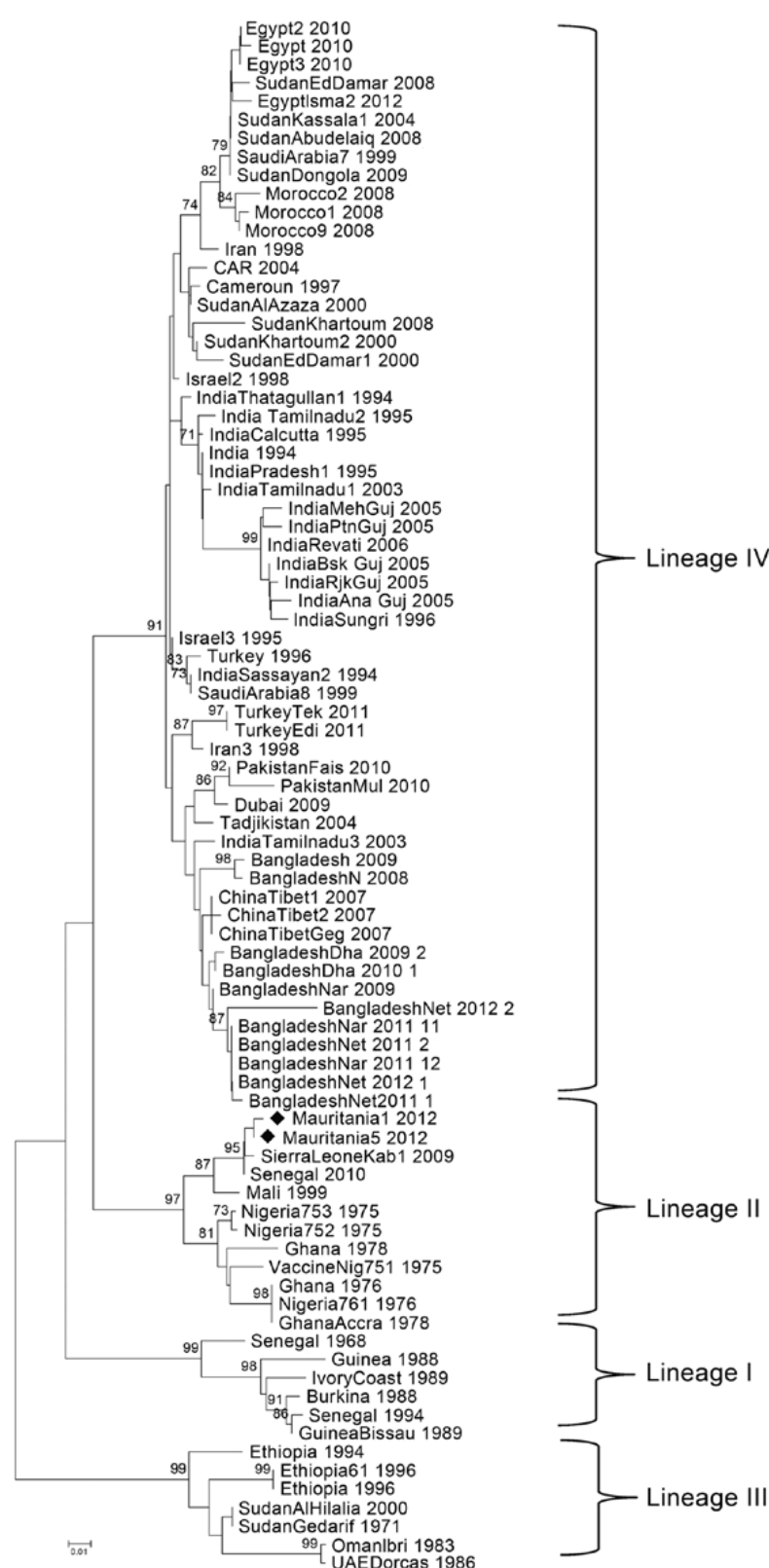


Figure. Phylogenetic tree based on the nucleoprotein gene of peste des petits ruminants viruses identified in Mauritania (black diamonds) and selected comparison sequences from GenBank. The neighbor-joining method was used for phylogenetic analysis; evolutionary distances were computed by using the Tamura 3-parameter method and a gamma distribution parameter with a value of 4 (9). CAR, Central African Republic; Nig, Nigeria; UAE, United Arab Emirates. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

was favorable for PPRV exchanges over the years.

Three suspected outbreaks of PPR were reported during January–March 2012 (online Technical Appendix Figure 2). Both sheep and goats were affected; the animals, particularly young animals, had signs typical of acute PPR. Illness rate ranged from 11% to 17% and case-fatality rates from 39% to 58%. Clinical signs lasted 27–39 days. A total of 43 animals were sampled for virus detection, and 12 animals from 2 sites tested positive by RT-PCR. Seroprevalence rates were estimated on larger samples, including recovering animals in the 3 outbreak locations; these rates were high for all 3 sites: 61%, 70%, and 75% ($n = 87$, 31, and 12, respectively).

N-gene sequences were obtained from 2 sheep swab specimens collected in Trarza during the outbreak survey in early 2012 (deposited in the GenBank under accession nos. KF483658 [Mauritania1_2012] and KF483659 [Mauritania5_2012]). These isolates were placed in a phylogenetic tree built from PPRV sequences recently collected in western (Senegal, Mali) and northern Africa (Morocco), as well as isolates from other parts of the world retrieved from GenBank. Phylogenetic analysis involved 255 nt located on the C terminus end of the NP gene of the virus (84 aa). The PPRV strain from Mauritania belonged to lineage II (Figure). Sequences were close to, but distinct from, those collected in Senegal and distinct from those identified in Morocco and northern Africa (lineage IV).

Our study results highlight 2 PPRV epidemiologic systems: northern Africa, where all identified PPRVs belonged to lineage IV and were closely related to PPRV initially identified in Sudan (5); and western Africa, where all identified PPRVs belonged to lineages I and II (3,4). This information might be useful for the design of regional control strategies. Ongoing monitoring of PPRV in

Mauritania is needed to watch for the possible spread of PPRV lineage IV from northern Africa.

Acknowledgments

We thank the National Centre of Livestock and Veterinary Research, Nouakchott, and the Mauritanian surveillance network for animal diseases for their support.

This study was partly funded by the European VACNADA project implemented by the African Union (International Bureau of Animal Resources, Nairobi), and by CIRAD grant ATP Emergence. A.S.E.A. received a scholarship granted by the French Embassy in Nouakchott (Service de Coopération et d'Action Culturelle).

**Ahmed Salem El Arbi,
Ahmed Bezeid El Mamy,
Habib Salami,
Ekatarina Isselmou,
Olivier Kwiatek,
Geneviève Libeau,
Yaghouba Kane,
and Renaud Lancelot**

Author affiliations: Ministère du Développement Rural, Nouakchott, Mauritania (A.S. El Arbi); Centre National d'Elevage et de Recherche Vétérinaire, Nouakchott (A.B. El Mamy, E. Isselmou); Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, France (H. Salami, O. Kwiatek, G. Libeau, R. Lancelot); Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier (H. Salami, O. Kwiatek, G. Libeau, R. Lancelot); and Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar, Dakar, Senegal (Y. Kane)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2002.131345>

References

1. Albina E, Kwiatek O, Minet C, Lancelot R, Servan de Almeida R, Libeau G. Peste des petits ruminants, the next eradicated animal disease? *Vet Microbiol*. 2013; 165:38–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.013>
2. Kwiatek O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlsson E, Karimov B, et al. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J Comp Pathol*. 2007;136:111–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.12.002>
3. Shaila MS, Shamaki D, Forsyth MA, Diallo A, Goatley L, Kitching RP, et al. Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Res*. 1996;43:149–53. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702\(96\)01312-3](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1702(96)01312-3)
4. Banyard AC, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatek O, Libeau G. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J Gen Virol*. 2010;91:2885–97. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.025841-0>
5. Kwiatek O, Ali YH, Saeed IK, Khalafalla AI, Mohamed OI, Obeida AA, et al. Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1223–31. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101216>
6. Le Jan C, Sow AD, Thiemoko C, François JL, Diouara A. Pneumopathies enzootiques des petits ruminants en Mauritanie: situation d'ensemble et approche expérimentale [in French]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1987;40:103–12.
7. Lemrabott OM, Elmamy OB, Diarra I, Baba OM, Bastiaensen P, Bendali F, et al. Peste bovine: limites de la sérologie? Cas de la Mauritanie [in French]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 2005;58:117–23.
8. Couacy-Hymann E, Roger F, Hurard C, Guillou JP, Libeau G, Diallo A. Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods*. 2002;100:17–25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00386-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00386-X)
9. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 2011;28:2731–9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Address for correspondence: Renaud Lancelot, UMR CMAEE, CIRAD, Campus International de Baillarguet, TAA-DIR/B, 34398 Montpellier, France; email: renaud.lancelot@cirad.fr



ORIGINAL ARTICLE

Impact and Epidemiological Investigations into the Incursion and Spread of Peste des Petits Ruminants in the Comoros Archipelago: An Increased Threat to Surrounding Islands

C. Cêtre-Sossah^{1,2,3}, O. Kwiatek^{2,4}, A. Faharoudine⁵, M. Soulé⁵, Y. O. Moutroifi⁵, M. A. Vrel^{1,2,3}, H. Salami^{2,4}, S. Rassoul⁶, M. Asnaoui⁶, Y. Moindjie⁵, E. Albina^{2,7}, G. Libeau^{2,4} and E. Cardinale^{1,2,3}

¹ UMR CMAEE, CIRAD, Sainte Clotilde, La Réunion, France

² UMR 1309 CMAEE, INRA, Montpellier, France

³ Plateforme de recherche CYROI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), Sainte Clotilde, La Réunion, France

⁴ UMR CMAEE, CIRAD, Montpellier, France

⁵ Vice-President, Ministry of Agriculture, Fisheries, Environment, Industry, Energy and Handicraft, Moroni, Republic of Comoros

⁶ Institut National de la recherche agricole, la pêche et l'environnement, Vice-présidence en charge de la Production, Moroni, Republic of Comoros

⁷ UMR CMAEE, CIRAD, Petit Bourg, Guadeloupe, France

Keywords:

emerging diseases; viral infections; Comoros archipelago; peste des petits ruminants; epidemiology

Correspondence:

C. Cêtre-Sossah. UMR CMAEE, CIRAD, 2 Rue Maxime Rivière, Sainte Clotilde, La Réunion 97490, France. Tel.: +33 2 62 93 88 24; Fax: +33 2 62 52 80 01; E-mail: cetre@cirad.fr

Received for publication September 2, 2014

doi:10.1111/tbed.12296

Summary

Late October 2012, a great number of deaths of unknown origin occurred in goat herds in the suburbs of Ngazidja, located in the Comoros archipelago. Few weeks later, laboratory testing requested by the animal health authorities resulted in the identification of peste des petits ruminants (PPR) infection. Notably, the Index case could be attributed to a sick goat imported from Tanzania. Viral isolation was successful from the lungs leading to the whole N nucleoprotein gene sequencing. Phylogenetic analysis revealed that the strain belongs to the lineage III which includes strains of eastern African origin. In addition, to evaluate the impact of PPR on the Comorian indigenous domesticated ruminant population, a cross-sectional PPR serological survey was conducted between April and July 2013. A low overall PPRV antibody prevalence 2.24% (95% CI [1.38; 3.08]) was detected with a Grande Comore prevalence of 3.34% (IC = [2.09; 4.63]) with a limited spread of the disease mainly due to farm practices such as limited contacts between farm animals and rapid slaughtering of sick animals.

Introduction

Peste des petits ruminants (PPR) is a highly contagious and devastating viral disease affecting mainly sheep and goats but which can infect a wide range of other domestic and non-domestic species such as goitered gazelles in Turkey (Gür and Albayrak, 2010), buffaloes in India (Govindarajan et al., 1997; Balamurugan et al., 2014) and camels in Sudan and Ethiopia where specific clinical signs such as respiratory syndromes have been described (Abraham et al., 2005; Banyard et al., 2010; Khalafalla et al., 2010; Kwiatek et al., 2011). Firstly identified in Ivory Coast in 1940, the disease is now widely distributed across much of sub-Saharan

Africa, Middle East and Asia including major parts of the Indian subcontinent progressing southward and northward to Africa affecting Gabon, Democratic Republic of Congo, Somalia and Tanzania (Gargadennec and Lalanne, 1942; Swai et al., 2009). Northern African countries such as Morocco, Tunisia and Algeria (Ayari-Fakhfakh et al., 2011; Kwiatek et al., 2011; De Nardi et al., 2012) as well as most provinces of Turkey are now considered as gates of entry to Europe (Yesilbaş et al., 2005). The disease incidence characterized by a high morbidity and mortality and the restrictions linked to animal and product movements demonstrate that PPR has a major economic impact, especially in rural African communities where ruminant

livestock production represents a major income. Trans-boundary diseases of farm animals, rather than being a diminishing problem across the world, are now emerging in areas where they have never been described before. Across the developing countries, viral pathogens like PPR virus (PPRV) represent a huge disease burden on agriculture, increasing poverty in some of the poorest parts of the world. The potential threat of PPR spreading to developed countries across the globe has rekindled interest in the *Morbillivirus* genus.

The causative agent PPRV belongs to the genus *Morbillivirus* (family *Paramyxoviridae*) and is a pleomorphic 150–700 nm enveloped RNA virus (Gibbs et al., 1979). Its genome consists of 15 948 nucleotides assembled in a unique negative single strand RNA molecule and encodes six structural proteins: the major nucleoprotein (N), the phosphoprotein (P), the matrix protein (M), the large protein (L) and the two external fusion (F) and hemagglutinin (H) glycoproteins that elicit protection against the disease in infected or vaccinated animals (Diallo et al., 2002; Berhe et al., 2003). Besides the six encoded structural proteins, the P gene, expresses the C and V nonstructural proteins via an alternative open reading frame and RNA editing, respectively (Barrett et al., 1991).

Phylogenetic constructs based on the partial fusion (F) protein gene [322 nucleotides (nt)] or the partial nucleoprotein (N) gene (255 nt) defined four geographically distinct PPRV lineages (I–IV) (Shaila et al., 1996; Kwiatak et al., 2007; Banyard et al., 2010). The three-first lineages were historically settled in Africa according to the geographical spread of the virus from the western part to the eastern part of Africa. The fourth lineage was originally confined to Asia, including Turkey and the Arabic peninsula before introduction and spread to northern and eastern-southern Africa in the last decade.

Early November 2012, a great number of deaths of unknown origin occurred in goat herds in the suburbs of Moroni-Ngazidja, in the Comoros archipelago (Fig. 1). Few weeks later, laboratory testing for several pathogens, including PPR and CCPP (Contagious Caprine Pleuropneumonia) was requested by the animal health authorities and resulted in the identification of PPR pathogen. Notably, the first probable reportable case identified as the Index case was a sick goat out of a couple of 'billy-goats' imported from Tanzania. Additional cases were reported at a larger scale. This paper presents the results of epidemiological and laboratory investigations on the PPR outbreaks in the Comoros archipelago. Phylogenetic analyses carried out on a successfully isolated virus revealed the close relationship of the strain with those of the eastern African lineage III. In addition, to evaluate the impact of PPR on the Comorian indige-

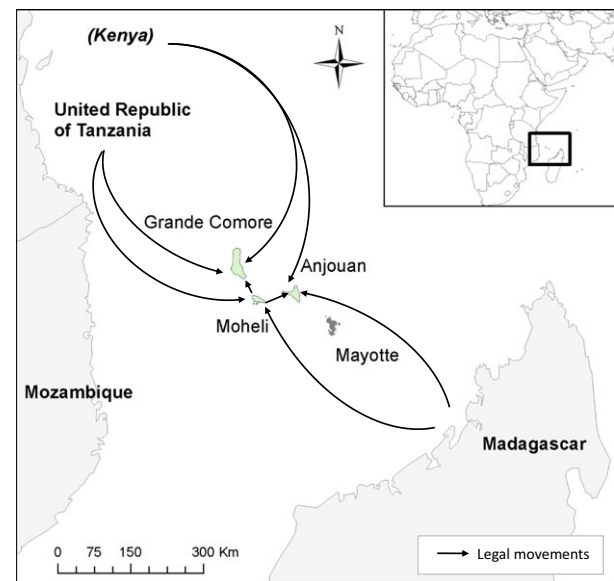


Fig. 1. Potential legal movements of animals occurring around the Comoros archipelago.

nous domesticated ruminant population, a cross-sectional serological survey was conducted between April and July 2013.

Materials and Methods

Study area, design and sampling

The Comoros islands form an archipelago of volcanic islands located off the south-eastern coast of Africa, east of Mozambique and north-west of Madagascar. The archipelago is divided between the sovereign state of the Union of Comoros composed of three islands named Grande Comore, Moheli and Anjouan, and the French overseas department of Mayotte (Fig. 1).

Firstly, to favour virus detection and identification, a total of 126 whole blood and serum samples were collected during the outbreak a week after the notification of the Index case in November 2012 from the villages of Batsa, Dima, Dzahani, M'beni, Ouellah and Sada Mouwaboi. Sick animals reported by the local authorities from the village of Ouellah were examined clinically and one, a young goat, displaying severe PPR clinical signs was euthanized and subjected to necropsy. Thirteen biological specimens (kidney, lungs, liver and spleen) were taken from this goat for virus identification and isolation. All samples were kept in liquid nitrogen and finally stored at -80°C to enhance chances of virus isolation.

Secondly, to assess the impact of the outbreak on the Comorian ruminant population, a cross-sectional study was conducted on the three Comorian islands. The region

was considered as the administrative unit in the study. A total of 1162 ruminant serum samples were collected from three villages randomly sampled per region between April and July 2013. Black and white circles presented on Fig. 3 illustrate the geographical location of the sampled villages of the study.

Animals sampled were as follows: 35 sheep, 114 bovines and 1013 goats. The sampling size and distribution was established using a multistage sampling method (village/farm/animal) using an α type I error of 5%, an estimated prevalence ranging from 0% to 53% depending on the region and resulting from a preliminary survey undertaken in November 2012 on 126 serum samples located in six separate villages of Grande Comore and a relative precision of 60% (Toma et al., 2010). An average of three animals per farm considered as the mean of the herd was sampled. Fixed intraclass coefficients were used as follows $\rho(\text{village}) = 0.1$ and $\rho(\text{farm}) = 0.25$ based on estimations performed in developing countries (Otte and Gumm, 1997). The sampling size and distribution in regions where the disease was not detected during the preliminary survey (Oichili and Dimani for Grande Comore and all the regions from Anjouan and Moheli) was established using a qualitative approach with an estimated prevalence of 0%, a threshold prevalence of 10% and an α type I error of 5%.

Detection of PPR antibodies

Sera were first tested by the IDScreen[®] PPR competition ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (IdVet[®], Grabels, France), the sensitivity and specificity of the test being estimated to 94.5% and 99.4% respectively (Libeau et al., 1995). The assays were performed and analysed according to the manufacturers' instructions. A Sunrise ELISA reader was used for reading at 450 nm (Tecan, Lyon, France). Optical density values were converted to inhibition percentages (IP). According to the cut-off value of the test, test samples with IP values $\leq 45\%$ were considered positive. To confirm their status, each of the PPR ELISA antibody positive samples and some negative samples randomly chosen were tested using the virus neutralizing test (VNT) considered as a gold standard method (OIE Terrestrial Manual, 2013). Briefly, duplicates of 2-fold serial dilutions of sera starting from 1 : 5 were added to 100 TCID₅₀ of PPR Nigeria 75/1 strain in 96-well microtitre plates and incubated for 1 h at 37°C. Next, 100 000 Vero cells were added to each well and the plates were incubated with 5% CO₂ for 5–6 days at 37°C. Titres were expressed as the inverse highest dilutions giving 50% of CPE. A positive control serum was included. A serum sample with a titre of 1 : 10 or higher was considered seropositive.

Virus isolation and amplification

The virus isolation was performed on lung tissue samples on CHS cells according to the methodology described by Adombi et al. (2011).

PPR genome detection

Nucleic acid preparation

One of the aliquots of the biological specimens was used for genomic viral RNA extraction and tissue culture virus isolation. Total RNA was extracted and eluted in a volume of 50 μ l using the NucleoSpin RNA virus[®] (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) amplified the partial 3' end of the N protein gene using the set of primers NP3/NP4 previously described (Couacy-Hymann et al., 2002) through a modification of the initial protocol using a 1-step method (One Step RT-PCR mix; Qiagen, Courtaboeuf, France) (Kwiatek et al., 2011). The amplification cycle consisted of an initial denaturation at 94°C, for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 30 s and a final extension cycle of 5 min at 72°C. Ten microlitre of the amplified products was analysed by electrophoresis on 1% agarose gel. For each of the positive samples, 40 μ l of the PCR product was directly sequenced (Beckman coulter genomics, Grenoble, France).

Partial N gene sequence was obtained from the isolate and deposited in the GenBank database under the accession number KM669158.

Sequence analysis, alignment and phylogenetic analysis

To compare the genetic relatedness of the newly isolated virus, phylogenetic analyses were performed with 71 published PPR sequences. Before phylogenetic inference, data sets and multiple sequence alignments were thoroughly examined to eliminate misalignments and ensure correct framing of coding sequences. Sequences were aligned by ClustalW and edited using MEGA version 6 software (Tamura et al., 2011). Putative recombination events in sequence alignments were assessed using RDP4 (Martin et al., 2010). Bayesian inference reconstruction was generated using Mr Bayes version 3.2.2 with random starting trees and run for 20 000 000 generations sampling the Markov chains at intervals of 1000 generations (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The evolution models were proposed by TREE-FINDER (March 2011, Jobb et al., 2004) according to the Akaike information criterion (AIC) (Akaike, 1974), the corrected AIC (AICc) (Sugiura, 1978), and Bayesian information criterion (BIC) (Schwarz, 1978) with a number of gamma rate categories fixed at 5. From these analyses, a general time-reversible (GTR) model with a discrete gamma distribution (+G) with five classes was the

29 discrete locations during the period 1968–2012 demonstrate that the Union of Comoros-2012-Ouellah strain belongs to the lineage III which could be further distinguished into two clusters, one grouping mainly Ethiopian isolates and one grouping Sudanese and Emirates isolates (Fig. 2). The grouping of the sequences within the clusters was supported by posterior probabilities $\geq 59\%$.

Serological survey and spatial distribution of the PPR seropositive animals

To investigate the impact of the PPR outbreak that occurred in November 2012 on the Comorian ruminant population health status, a total of 1162 sera were tested by

The virus was successfully isolated from lung tissues known to be one of the most suitable tissue samples for isolation because it is generally the site of the highest viral production. Sequences were aligned with a set of PPRV isolate sequences retrieved from GenBank. To estimate the geographic origin of the PPRV, Bayesian inference reconstruction based on 71 partial N gene sequences collected from



high-specificity ELISA tests to specific antibody acquisitions between April and July 2013, 5 months after the outbreaks. Figure 3 shows the geographical distribution of the detected PPR seropositive animals. The overall observed PPR prevalence rate was 2.24% (95% Confidence Intervals (CI) [1.38; 3.08]) in the three islands and 3.34% (95% CI = [2.09; 4.63]) for Grande Comore by itself and 0% for Anjouan and Moheli.

Observed herd prevalence was 6.32% (IC = [3.97; 8.67]) for the three Comorian islands of the archipelago but 8.67% (IC = [5.49; 11.85]) for Grande Comore and 0% for Anjouan and Moheli. These findings were supported by a significant statistical difference in the PPR prevalence rate between species (Fisher exact test, $P < 0.05$).

Spatial distribution of the PPR seropositive animals

Results of exposure to PPR indicated by ELISA detection of specific antibodies supported by the high specificity of the tests used is presented in Fig. 3. PPR positive results were

found only in Grande Comore in 24 goat and two bovine samples and no sheep samples among the 374 separate localities distributed on the northern-western part of the island suggesting PPR spread from the Index case in link with animal movements northwards. Neither Moheli nor Anjouan was found to be infected by PPR.

Discussion

In the present study we describe the first introduction of PPR in goats in Grande Comore, one of the three islands of the Comoros archipelago. Objective clinical signs and serological evidence of PPRV infection constitute a direct indication of the presence of PPRV in this island even though the disease was evidenced in goats while remaining absent in sheep. These results highlight the new threat for the surrounding islands of the archipelago.

Phylogenetic analysis revealed that the strain involved in the outbreak of the village of Ouellah belonged to lineage III. This result is compatible with the known historic

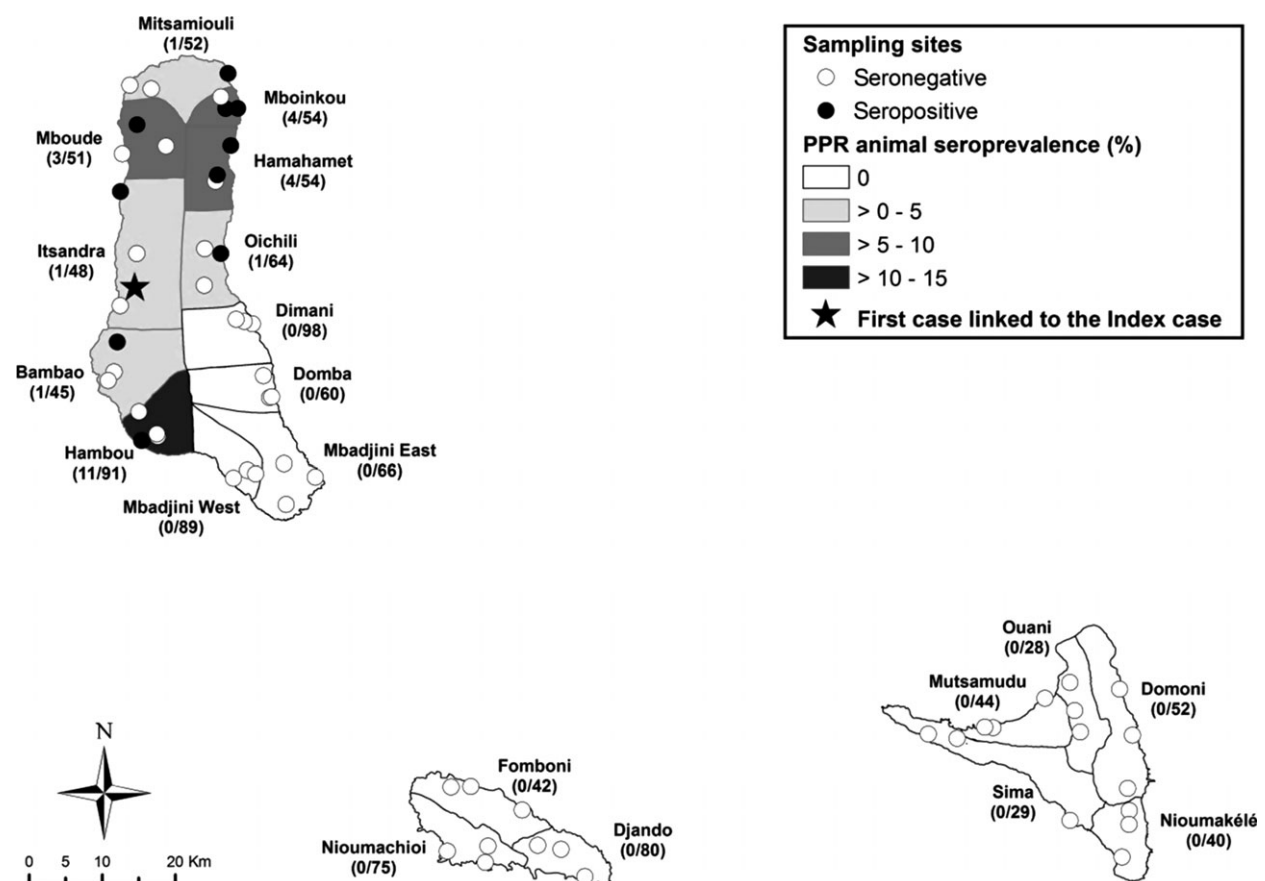


Fig. 3. Bayesian phylogenetic reconstruction showing the peste des petits ruminants (PPR) relationships based on partial N gene sequences (255 nucleotides). RPV stands for rinderpest. The measles and rinderpest strains were used as outgroups. Numbers indicate posterior probabilities. The scale bar indicates the expected nucleotide changes per site.

establishment of lineage III in East Africa. East Africa is generally used to specifically refer to the area now comprising the countries of Kenya, Tanzania and Uganda but often includes Somalia, Djibouti, Ethiopia and Eritrea. Historical strains, such as the isolate from wildlife in Oman (1983), isolates from the United Arab Emirates (1983 and 1986), isolates from Sudan (1971, 1972 and 2000) and 2 isolates from Ethiopia grouped in lineage III. However, in the area encompassing Sudan, Uganda, Ethiopia, Eritrea Somalia and Kenya, recent findings suggest that lineage IV has largely replaced PPRV lineage III (Cosseddu et al., 2013; Maganga et al., 2013; Libeau et al., 2014). Based on literature, Tanzania is one of the Eastern African countries where lineage III is still active, the PPR diagnosis being confirmed by serology (Karimuribo et al., 2011). A recent study confirmed recent introduction of PPR in southern Tanzania (in 2009) through newly purchased goats from a livestock market located about 700 km in the outskirts of Dar es Salaam city. The presence of PPR in Tanzania, being a great gate of animal exportation is obviously at high risk of southward spread of the disease to other southern African countries (Muse et al., 2012). However, the virus, which was introduced into Tanzania by southward spread from neighbouring countries, was probably in Tanzania long before official confirmation of the disease (Swai et al., 2009). Focusing on the Indian Ocean region, the origin of the PPRV strain causing outbreaks in Grande Comore can be explained by the introduction of lineage III crossing away the Mozambique Channel. The spread of PPR known to be a highly contagious disease is probably linked to animal movements which could be legal animal importations since 2002.

In the present study, serological detection methods were used to evaluate seroconversion among sheep and goat herds from 374 different geographical localities in Grande Comore after the November 2012 PPR outbreak.

The low level of PPR seroprevalence (2.24%), mainly in goats was seen along with a low Grande Comore seroprevalence of 3.34%. Ecological parameters, low number of animals per herd may explain the low level of seroprevalence observed in the Comorian ruminant population around 6 months after the outbreak. Limited spread of the disease may also be explained by farmer practices which were to slaughter animals when the animal health local authorities first described clinical signs. The volcanic topology limiting the direct contact among animals in association with farm practices is likely to be the key factor for the limited spread of PPR in the Comorian livestock population.

In cattle, seroprevalence was of 1.78%. In Tanzania, mass PPR vaccination of sheep and goats was initiated early 2011 but did not include cattle. However, high rate of PPR seropositivity found in several studies (Abraham et al., 2005; Lembo et al., 2013; Balamurugan et al., 2014) confirm that cattle living in close proximity to small ruminants are likely

to be infected frequently. Although subclinical cattle seroconversion and alternative host infections (lions and camels) (Balamurugan et al., 2012; El Arbi et al., 2014) have been observed in several occasions, the epidemiological role of these species for the disease is not yet established.

Livestock export is of major economic importance for many African countries. The presence of quarantine in the country of importation will help avoiding disease introduction as it has been already the case in the past for East coast fever in 2003 and 2004 and Rift Valley fever in the Union of Comoros since 2011 (De Deken et al., 2007; Roger et al., 2014). Port inspection, extended quarantine with detection of infections by clinical examination and laboratory screening, vaccination of animals for key diseases before entry to the quarantine reduce the risk of disease introduction (Knight-Jones et al., 2014). To protect livestock exports from costly trading bans in case of disease emergence, better certification of livestock health status is needed. Quantitative risk assessment studies and cost-effectiveness analysis on different health certification protocols have been performed for Somali livestock exports for six transboundary diseases. Intensive vaccination campaigns have been used to stop the continued spread of PPRV in several countries such as Kenya, Somalia and Tanzania. However, inadequate funding, limited stocks of vaccines, shortage of trained staff to coordinate vaccination programmes, occurring in many African countries, are crucial key points for the surveillance and the control of any animal diseases and specifically direct contact transmitted-diseases without any vectors being involved.

In conclusion, improving surveillance through protocols and contingency plans need to be reinforced in order to control the disease spread with appropriate measures (vaccines, sentinel herds). Concerted and collaborative efforts in prevention and control of the disease across the Mozambique Channel need to be strengthened in link with animal movements with further studies on the virus spread, prevalence and risk factors associated with the disease.

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgements

This study was conducted in the framework of AnimalRisk-OI, a research programme on emerging animal diseases in the Indian Ocean, funded by FEDER POCT (European Union, Regional Council of Reunion Island and the French government). We thank the farmers, vets and veterinary technicians for their participation in the field work. The authors would like to thank Mr Mohammed Ali, Mr Johny Hoarau, Sébastien Girard for their technical assistance.

References

- Abraham, G., A. Sintayehu, G. Libeau, E. Albina, F. Roger, Y. Laekemariam, D. Abayneh, and M. Awoke, 2005: Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (PPR) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 70, 51–57.
- Adombi, C. M., M. Lelenta, C. E. Lamien, D. Shamaki, Y. M. Koffi, A. Traoré, R. Silber, E. Couacy-Hymann, S. C. Bodjo, J. A. Djaman, A. G. Luckins, and A. Diallo, 2011: Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J. Virol. Methods* 173, 306–313.
- Akaike, H., 1974: A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control* 19, 716–723.
- Ayari-Fakhfakh, E., A. Ghram, A. Bouattour, I. Larbi, L. Gribâa-Dridi, O. Kwiatek, M. Bouloy, G. Libeau, E. Albina, and C. Cêtre-Sossah, 2011: First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *Vet. J.* 187, 402–404.
- Balamurugan, V., A. Sen, G. Venkatesan, V. Bhanot, V. Yadav, V. Bhanuprakash, and R. K. Singh, 2012: Peste des petits ruminants virus detected in tissues from an Asiatic lion (*Panthera leo persica*) belongs to Asian lineage IV. *J. Vet. Sci.* 13, 203–206.
- Balamurugan, V., P. Krishnamoorthy, D. S. Raju, K. K. Rajak, V. Bhanuprakash, A. B. Pandey, M. R. Gajendragad, K. Prabhudas, and H. Rahman, 2014: Prevalence of Peste-des-petits ruminant virus antibodies in cattle, buffaloes, sheep and goats in India. *Virusdisease* 25, 85–90.
- Banyard, A. C., S. Parida, C. Batten, C. Oura, O. Kwiatek, and G. Libeau, 2010: Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *J. Gen. Virol.* 91, 2885–2897.
- Barrett, T., S. M. Subbarao, G. J. Belsham, and B. W. J. Mahy, 1991: The molecular biology of the morbilliviruses. In: Kingsbury, D. W. (ed.), *The Paramyxoviruses*, pp. 83–102. Plenum Press, New York.
- Berhe, G., C. Minet, L. Goff, T. Barrett, A. Ngangnou, C. Grillet, G. Libeau, M. Fleming, D. N. Black, and A. Diallo, 2003: Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against Peste-des-Petits-Ruminants Virus and Capripoxvirus infections. *J. Virol.* 77, 1571–1577.
- Cosseddu, G. M., C. Pinoni, A. Polci, T. Sebhatu, R. Lelli, and F. Monaco, 2013: Characterization of peste des petits ruminants virus, Eritrea, 2002–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 160–161.
- Couacy-Hymann, E., F. Roger, C. Hurard, J. P. Guillou, G. Libeau, and A. Diallo, 2002: Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 100, 17–25.
- De Deken, R., V. Martin, A. Saido, M. Madder, J. Brandt, and D. Geysen, 2007: An outbreak of East Coast Fever on the Comoros: a consequence of the import of immunised cattle from Tanzania. *Vet. Parasitol.* 143, 245–253.
- De Nardi, M., S. M. Lamin Saleh, C. Batten, C. Oura, A. Di Nardo, and D. Rossi, 2012: First evidence of peste des petits ruminants (PPR) virus circulation in Algeria (Sahrawi territories): outbreak investigation and virus lineage identification. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 214–222.
- Diallo, A., C. Minet, G. Berhe, C. Le Goff, D. N. Black, M. Fleming, T. Barrett, C. Grillet, and G. Libeau, 2002: Goat immune response to capripox vaccine expressing the hemagglutinin protein of peste des petits ruminants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 88–91.
- El Arbi, A. S., A. B. El Mamy, H. Salami, E. Isselmou, O. Kwiatek, G. Libeau, Y. Kane, and R. Lancelot, 2014: Peste des petits ruminants virus, Mauritania. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 333–336.
- Gargadennec, L., and A. Lalanne, 1942: La peste des petits ruminants. *Bull. Serv. Zoo. AOF* 5, 16–21.
- Gibbs, E. P., W. P. Taylor, M. J. Lawman, and J. Bryant, 1979: Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirology* 11, 268–274.
- Govindarajan, R., A. Koteeswaran, A. T. Venugopalan, G. Shyam, S. Shaouna, M. S. Shaila, and S. Ramachandran, 1997: Isolation of peste des petits ruminants virus from an outbreak in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet. Rec.* 141, 573–574.
- Gür, S., and H. Albayrak, 2010: Seroprevalence of peste des petits ruminants (PPR) in goitered gazelle (*Gazella subgutturosa subgutturosa*) in Turkey. *J. Wildl. Dis.* 46, 673–677.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist, 2001: Mr Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Jobb, G., A. von Haeseler, and K. Strimmer, 2004: TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4, 18.
- Karimuribo, E. D., P. M. Loomu, L. S. B. Mellau, and E. S. Swai, 2011: Retrospective study on sero-epidemiology of peste des petits ruminants before its official confirmation in northern Tanzania in 2008. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 1, 184–187.
- Khalafalla, A. I., I. K. Saeed, Y. H. Ali, M. B. Abdurrahman, O. Kwiatek, G. Libeau, A. A. Obeida, and Z. Abbas, 2010: An outbreak of peste des petits ruminants (PPR) in camels in the Sudan. *Acta Trop.* 116, 161–165.
- Knight-Jones, T. J., F. Njeumi, A. Elsayalhy, J. Wabacha, and J. Rushton, 2014: Risk assessment and cost-effectiveness of animal health certification methods for livestock export in Somalia. *Prev. Vet. Med.* 113, 469–483.
- Kwiatek, O., C. Minet, C. Grillet, C. Hurard, E. Carlsson, B. Karimov, E. Albina, A. Diallo, and G. Libeau, 2007: Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan. *J. Comp. Pathol.* 136, 111–119.
- Kwiatek, O., Y. H. Ali, I. K. Saeed, A. I. Khalafalla, O. I. Mohamed, A. A. Obeida, M. B. Abdelrahman, H. M. Osman, K. M. Taha, Z. Abbas, M. El Harrak, Y. Lhor, A. Diallo, R. Lancelot, E. Albina, and G. Libeau, 2011: Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1223–1231.
- Lembo, T., C. Oura, S. Parida, R. Hoare, L. Frost, R. Fyumagwa, F. Kivaria, C. Chubwa, R. Kock, S. Cleaveland, and C. Batten, 2013: Peste des petits ruminants infection among cattle and

- wildlife in northern Tanzania. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2037–2040.
- Libeau, G., C. Préhaud, R. Lancelot, F. Colas, L. Guerre, D. H. Bishop, and A. Diallo, 1995: Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the Peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. Vet. Sci.* 58, 50–55.
- Libeau, G., A. Diallo, and S. Parida, 2014: Evolutionary genetics underlying the spread of Peste des Petits Ruminants virus. *Animal Frontiers* 4, 14–20.
- Maganga, G. D., D. Verrier, R. M. Zerbinati, C. Drosten, J. F. Drexler, and E. M. Leroy, 2013: Molecular typing of PPRV strains detected during an outbreak in sheep and goats in south-eastern Gabon in 2011. *Viol. J.* 10, 82.
- Martin, D. P., P. Lemey, M. Lott, V. Moulton, D. Posada, and P. Lefevre, 2010: RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462–2463.
- Muse, E. A., E. D. Karimuribo, G. C. Gitao, G. Misinzo, L. S. Mellau, P. L. Msoffe, E. S. Swai, and M. O. Albano, 2012: Epidemiological investigation into the introduction and factors for spread of Peste des Petits Ruminants, southern Tanzania. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 79, 457.
- OIE Terrestrial Manual, 2013. Chapter 2.7.11. Peste des Petits Ruminants. 3. Serological tests. pp. 7.
- Otte, M. J., and I. D. Gumm, 1997: Intra-cluster correlation coefficients of 20 infections calculated from the results of cluster-sample surveys. *Prev. Vet. Med.* 31, 147–150.
- Roger, M., M. Beral, S. Licciardi, M. Soulé, A. Faharoudine, C. Foray, M. M. Olive, M. Maquart, A. Soulimane, A. Madi Kassim, C. Cêtre-Sossah, and E. Cardinale, 2014: Evidence for circulation of the Rift Valley fever virus among livestock in the Union of Comoros. *PLoS Negl. Trop Dis.* 31, e3045. doi:10.1371/journal.pntd.0003045.
- Schwarz, G., 1978: Estimating the dimension of a model. *Ann. Stat.* 6, 461–464.
- Shaila, M. S., D. Shamaki, M. A. Forsyth, A. Diallo, R. P. Kit-ching, and T. Barrett, 1996: Geographic distribution and epidemiology of peste des petits ruminants virus. *Virus Res.* 43, 149–153.
- Sugiura, N., 1978: Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections. *Commun. Stat. Theory Methods* 7, 13–26.
- Swai, E. S., A. Kapaga, F. Kivaria, D. Tinuga, G. Joshua, and P. Sanka, 2009: Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus antibodies in various districts of Tanzania. *Vet. Res. Commun.* 33, 927–936.
- Tamura, K. P. D., N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, 2011: S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 10, 2731–2739.
- Toma, B., B. Dufour, J. J. Bénet, M. Sanaa, A. Shaw, and F. Moutou, 2010: *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*, 3rd edn. AE-EMA, Maisons-Alfort.
- Yesilbaş, K., Z. Yilmaz, E. Gölcüand, and A. Ozkul, 2005: Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Vet. Rec.* 157, 260–261.